



Consecuencias de las alteraciones en la expresión de Aurora quinasa B sobre la segregación cromosómica y la progresión del ciclo celular

Trabajo realizado por la Licenciada Marta Muñoz Barrera en el
Departamento de Genética de la Universidad de Sevilla y en el
Departamento de Biología Molecular de CABIMER, para optar al grado
de Doctor en Biología

Sevilla, 2016

Doctorando:

Director de la tesis:

Tutor de la tesis:

Marta Muñoz Barrera

Fernando Monje Casas

Andrés Aguilera López

Agradecimientos

A mi director de tesis, Fernando Monje, por la dedicación y entrega mostrada durante estos años.

A mis compañeros, por ayudarme, apoyarme y animarme; así como a todas las personas que de una forma u otra han sido partícipes de la realización de esta Tesis Doctoral y me han acompañado en mi estancia en CABIMER.

A mis amigos, con los que llegué y a los que me llevo de esta etapa (algunos convertidos en verdaderos familiares científicos) que, sin duda alguna, si los enumerara, formarían parte de un Capítulo 4 de Resultados.

A mi familia, la biológica y la que no lo es, la que sigue conmigo y la que se fue, por darme las fuerzas y el aliento necesario y obligarme a no desistir.

A mis padres, a mi hermana, a Julia y a Ana: *“porque los mayores tesoros que tengo no los he comprado”*.

El trabajo de esta Tesis Doctoral ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (BFU2011-23436; BFU2013-43718-P) y la Junta de Andalucía (P10-CVI-5806). Marta Muñoz Barrera ha disfrutado de una beca predoctoral JAE predoc-2011 del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Índice General

1	Introducción.....	1
1.1	El ciclo celular	1
1.2	Regulación de la segregación cromosómica	4
1.2.1	Punto de control de ensamblaje del huso (SAC)	7
1.2.2	Aurora B y el Complejo Pasajero del Cromosoma (CPC).....	13
1.3	Otras funciones del Complejo Pasajero del Cromosoma	26
1.3.1	Condensación y estructura del cromosoma mitótico	26
1.3.2	Ensamblaje de la zona media del huso	29
1.3.3	Formación del cuerpo medio y ensamblaje del anillo contráctil.....	32
1.3.4	Control de la abscisión	33
1.4	Aurora quinasa y cáncer.....	36
1.4.1	Niveles de expresión de Aurora quinasa y cáncer.....	36
1.4.2	Uso de inhibidores de Aurora como quimioterapéuticos	37
2	Objetivos	41
3	Resultados.....	43
3.1	Reevaluación de la relación funcional entre Aurora B y el punto de control de ensamblaje del huso.....	43
3.1.1	La reducción de la actividad quinasa de Ipl1 determina defectos sinérgicos de segregación cromosómica y viabilidad celular en mutantes deficientes en el SAC	44
3.1.2	El retraso de la activación de Ipl1 en el ciclo celular hace al SAC esencial para la segregación correcta de los cromosomas.....	49
3.2	Análisis de las consecuencias del incremento de actividad quinasa Aurora B en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	57
3.2.1	La sobreexpresión de Ipl1 y Sli15 es letal en células de levadura	57

3.2.2	Los niveles incrementados de Ipl1 y Sli15 provocan inestabilidad del huso y un bloqueo en el ciclo celular	60
3.2.3	La sobreexpresión de Ipl1 y Sli15 conduce a problemas graves de segregación cromosómica	65
3.2.4	Los problemas de segregación causados por el incremento de expresión de Ipl1 y Sli15 no dependen del aumento en la fosforilación de la serina 10 de la histona H3	70
3.2.5	La sobreexpresión de Glc7 no revierte los fenotipos asociados al incremento de actividad Ipl1	72
3.2.6	El incremento de actividad quinasa Ipl1 provoca inestabilidad del huso por alteración de la función de Ase1	73
3.2.7	El incremento de actividad quinasa Ipl1 causa la desestabilización de las uniones microtúbulo-cinetocoro	81
3.2.8	La expresión incrementada de Ipl1 y Sli15 activa constitutivamente el punto de control de ensamblaje del huso	87
3.2.9	La inactivación del punto de control de ensamblaje del huso permite la citocinesis en células con niveles incrementados de Ipl1 y Sli15	93
3.2.10	El incremento de expresión del homólogo humano Aurora B en levaduras conduce a letalidad celular	96
3.3	Análisis del incremento de los niveles de expresión de Aurora quinasa B e INCENP en líneas celulares humanas	99
3.3.1	La expresión incrementada de Aurora B e INCENP provoca un incremento sinérgico de la actividad quinasa de Aurora B.....	99
3.3.2	La sobreexpresión conjunta de Aurora B e INCENP en líneas celulares humanas provoca letalidad celular pero no un bloqueo mitótico	102
3.3.3	El incremento simultáneo de la expresión de Aurora B e INCENP causa inestabilidad genómica	104
3.3.4	La letalidad celular provocada por el incremento de expresión de Aurora B e INCENP no se asocia a un proceso de senescencia	108
3.3.5	La letalidad causada por el incremento de expresión simultáneo de Aurora B e INCENP se asocia posiblemente a un proceso apoptótico	109
4	Discusión	111
4.1	Reevaluación de la relación funcional entre Aurora B y el punto de control de ensamblaje del huso.....	111

4.2	Análisis de las consecuencias del incremento de actividad quinasa Aurora B en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	117
4.3	Análisis del incremento simultáneo en los niveles de expresión de Aurora quinasa B e INCENP en líneas celulares humanas.....	128
5	Conclusiones	133
6	Materiales.....	135
6.1	Organismos modelo	135
6.1.1	Estirpes de <i>Escherichia coli</i>	135
6.1.2	Estirpes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	135
6.1.3	Líneas celulares de humanos	135
6.2	Reactivos químicos.....	136
6.2.1	Antibióticos y otros reactivos para medios selectivos	136
6.2.2	Reactivos para el estudio del ciclo celular.....	136
6.2.3	Reactivos empleados para la extracción de proteínas	137
6.3	Enzimas	137
6.4	Tampones y soluciones.....	139
6.5	Medios de cultivo	141
6.5.1	Medios de cultivo para <i>Escherichia coli</i>	141
6.5.2	Medios de cultivo para <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	141
6.5.3	Medios de cultivo para líneas celulares	142
7	Métodos.....	143
7.1	Conservación de estirpes, cepas bacterianas y líneas celulares	143
7.1.1	<i>Escherichia coli</i>	143
7.1.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	143
7.1.3	Líneas celulares	143

7.2	Extracción de ácidos nucleicos.....	144
7.2.1	Extracción de ADN plasmídico de <i>Escherichia coli</i> (miniprep)	144
7.2.2	Extracción de ADN genómico de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	144
7.2.3	Extracción de ARN de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	145
7.3	Transformación de <i>Escherichia coli</i>	146
7.4	Obtención de cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	146
7.4.1	Generación de estirpes mediante cruces genéticos	146
7.4.2	Transformación	147
7.4.3	Deleción y etiquetado de genes.....	147
7.4.4	Construcción del alelo condicional <i>pMET3-Ub-DHFR-IPL1</i>	148
7.4.5	Construcción de los mutantes de sobreexpresión	148
7.4.6	Construcción de los alelos <i>ipl1-as5</i> y <i>ipl1-D227A</i>	149
7.4.7	Construcción del alelo <i>CDC20-AID</i>	150
7.5	Cultivo y modificación de líneas celulares	150
7.5.1	Subcultivo de líneas celulares adherentes.....	150
7.5.2	Transfección.....	151
7.5.3	Producción de lentivirus	151
7.5.4	Titulación de lentivirus	152
7.5.5	Infección con lentivirus.....	152
7.6	Ensayos de viabilidad celular	153
7.6.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	153
7.6.2	Líneas celulares	153
7.7	Ensayo de pérdida de plásmido.....	153
7.8	Sincronización de cultivos de <i>S. cerevisiae</i>	154
7.8.1	Sincronización en G1 con factor alfa	154
7.8.2	Sincronización en fase S con hidroxiurea	155
7.9	Análisis de la progresión del ciclo mediante el estudio de la gemación.	155
7.9.1	Digestión de la pared celular con liticasa	155

7.10	Análisis del contenido genómico mediante citometría de flujo (FACS) ..	156
7.10.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	156
7.10.2	Líneas celulares	156
7.11	Técnicas de microscopía.....	157
7.11.1	Análisis de la localización de proteínas fluorescentes en <i>S. cerevisiae</i>	157
7.11.2	Tinción con calcoflúor	157
7.11.3	Microscopía en tiempo real (<i>time-lapse</i>).....	158
7.11.4	Inmunofluorescencia	158
7.12	Análisis de los niveles de expresión mediante PCR cuantitativa.....	162
7.13	Extracción de proteínas y análisis Western.....	163
7.13.1	Extracción de proteínas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	163
7.13.2	Extracción de proteínas de líneas celulares.....	163
7.13.3	Tratamiento de muestras proteicas con fosfatasa alcalina	164
7.13.4	Análisis Western	164
8	Anexos	167
8.1	Tablas.....	167
8.2	Abreviaturas	174
9	Bibliografía	176

Índice de Figuras y Tablas

Figura I1. El ciclo celular de una célula de metazoo y de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
Figura I2. Representación esquemática de la estructura del cinetocoro de <i>S. cerevisiae</i> y humanos	5
Figura I3. Tipos de unión de los cromosomas al huso	6
Figura I4. Relación entre el SAC y la maquinaria del ciclo celular	8
Figura I5. Principios de activación del SAC.....	10
Figura I6. Estructura del CPC humano	14
Figura I7. Localización y función del CPC durante la mitosis.....	20
Figura I8. Modelo de separación espacial de corrección de uniones microtúbulo-cinetocoro por Aurora B.....	25
Figura I9. Modelo para la regulación de Aurora B y la descondensación de la cromatina durante la salida de mitosis	28
Figura I10. Establecimiento de la zona media del huso en la transición metafase-anafase	31
Figura I11. Regulación de la abscisión por el CPC	35
Figura R1. Diferencia de fenotipos asociados a la falta del SAC y a la actividad reducida de Ipl1.....	46
Figura R2. Diferencia de fenotipos asociados a la falta del SAC y a la actividad reducida de Ipl1.....	48
Figura R3. Generación de un nuevo alelo condicional de IPL1	50
Figura R4. Caracterización del alelo <i>CDC20-AID</i>	51
Figura R5. Funcionalidad del alelo <i>pMET3-Ub-DHFR-IPL1</i>	52
Figura R6. Retraso del inicio de actividad de Ipl1 durante la progresión del ciclo celular	55
Figura R7. Retraso del inicio de la actividad de Ipl1 hasta fase S.....	56
Figura R8. La sobreexpresión simultánea de Ipl1 y Sli15 afecta la viabilidad celular	59
Figura R9. La sobreexpresión de Ipl1 y Sli15 determina un bloqueo del ciclo celular	61

Figura R10. Análisis de la progresión del ciclo celular tras la sobreexpresión de Ipl1 y Sli15.....	64
Figura R11. Análisis de la elongación del huso mitótico mediante microscopía en tiempo real	65
Figura R12. La sobreexpresión de Ipl1 y Sli15 provoca defectos en segregación cromosómica	67
Figura R13. Los fenotipos asociados a la sobreexpresión de Ipl1 y Sli15 son dependientes de la actividad quinasa	68
Figura R14. La duplicación de los genes IPL1 y SLI15 provoca un incremento en la inestabilidad genómica.....	72
Figura R15. Los problemas de segregación cromosómica asociados a la sobreexpresión de Ipl1 y Sli15 no dependen del incremento de fosforilación de la serina 10 de la histona H3.....	71
Figura R16. La sobreexpresión de la actividad fosfatasa Glc7 no suprime los fenotipos asociados al incremento de actividad Ipl1	73
Figura R17. La inestabilidad del huso se debe a fallos en la localización de Ase1 y no del CPC.....	75
Figura R18. La inestabilidad del huso está asociada a un defecto en la función de Ase1.....	77
Figura R19. La inestabilidad del huso asociada a la depleción de las cohesinas en células bloqueadas en metafase no está asociada a un defecto de función de Ase182	
Figura R20. La inestabilidad del huso está asociada al estado de fosforilación de Ase1.....	84
Figura R21. El incremento de expresión de Ipl1 y Sli15 provoca la desestabilización continua de las uniones microtúbulo-cinetocoro.....	86
Figura R22. El incremento de la expresión de Ipl1 y Sli15 aumenta la distancia media entre los centrómeros y el SPB más cercano	88
Figura R23. El incremento de actividad de Ipl1 conduce a una hiperfosforilación de Dam1.....	89
Figura R24. La sobreexpresión de Ipl1 y Sli15 conduce a una activación constitutiva del SAC.....	91

Figura R25. La inactivación del SAC permite la degradación de Pds1 y Clb2 en condiciones de elevada actividad Ipl1	93
Figura R26. La delección de <i>MAD1</i> en las células que sobreexpresan Ipl1 y Sli15 provoca la cosegregación de los SPBs	95
Figura R27. La falta de citocinesis está asociada a la activación del SAC y no de la ruta NoCut.....	98
Figura R28. La sobreexpresión de Aurora B en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> provoca letalidad celular y se comporta como un dominante negativo.....	100
Figura R29. Sobreexpresión de Aurora B e INCENP en células 293T	103
Figura R30. La sobreexpresión conjunta de Aurora B e INCENP incrementa la estabilidad de la subunidad reguladora.....	104
Figura R31. La sobreexpresión conjunta de Aurora B e INCENP supone un aumento sinérgico de la actividad quinasa.....	105
Figura R32. La sobreexpresión conjunta de Aurora B e INCENP conduce a letalidad celular	106
Figura R33. El incremento de expresión de Aurora B e INCENP no provoca un bloqueo en mitosis	107
Figura R34. Análisis de la progresión del ciclo celular mediante la morfología del huso mitótico y del núcleo.....	109
Figura R35. La sobreexpresión simultánea de Aurora B e INCENP causa inestabilidad genómica.....	110
Figura R36. El incremento de expresión de Aurora B e INCENP se asocia a un proceso de muerte celular programada	113
Figura M1. Esquema de la PCR solapante llevada a cabo para la obtención del alelo <i>ipl1-D227A</i>	153
Tabla 1. Estirpes utilizadas.....	167
Tabla 2. Cebadores.....	171
Tabla 3. Condiciones de bloqueo usadas en análisis Western	172
Tabla 4. Anticuerpos usados en análisis Western.....	172
Tabla 5. Homólogos de proteínas de humanos y de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ..	173

1 Introducción

1.1 El ciclo celular

El ciclo celular es una sucesión ordenada de procesos que conducen a la duplicación de una célula. Originalmente, este proceso se dividió en dos etapas: interfase y mitosis (1). La interfase comprende dos fases de crecimiento celular (G1 y G2), entre las que tiene lugar la duplicación del ADN durante la denominada fase de síntesis o fase S. Durante G1, la célula se prepara para la síntesis del ADN; mientras que en G2, se prepara para poder llevar a cabo la mitosis (2). Tras la duplicación del material genético, cada cromosoma está constituido por dos cromátidas hermanas, que inicialmente se mantienen unidas entre sí por un complejo conservado de proteínas denominadas cohesinas (3, 4). A continuación, durante la mitosis, se produce la distribución del material genético duplicado (5). Para la segregación de los cromosomas, es fundamental en todos los eucariotas la formación del huso mitótico, un haz bipolar de microtúbulos que actúa como la maquinaria responsable, en última instancia, del reparto del material genético entre las células hijas resultantes de la división celular (5). Los centrosomas, o los cuerpos polares del huso (SPBs) en el caso de *S. cerevisiae*, son clave en el ensamblaje y la organización del huso. Se trata de centros organizadores de microtúbulos que se sitúan en polos opuestos del huso en células mitóticas, y desde los que nuclea los microtúbulos que forman el mismo (6).

Las distintas etapas en las que se divide la mitosis eucariota se definen típicamente en base a los sucesivos eventos cromosómicos (Figura I1) (5). Durante profase, empieza la condensación de los cromosomas y el huso comienza a ensamblarse. En prometafase, la envuelta nuclear se desintegra (en el caso de eucariotas superiores, que llevan a cabo una mitosis abierta) y los cromosomas son capturados por el huso. En *S. cerevisiae*, no existe una distinción clara entre profase y prometafase, pues este organismo lleva a cabo una mitosis cerrada, es decir, la envoltura nuclear

no se desintegra, por lo que los SPBs permanecen embebidos en la membrana nuclear y la distribución del material genético tiene lugar dentro del núcleo (6-8). En metafase, los cromosomas se sitúan en la zona media del huso gracias a su unión a microtúbulos provenientes de polos opuestos del mismo, un estado conocido como bi-orientación de los cromosomas. Cuando todos los cromosomas se han unido correctamente a los microtúbulos del huso en metafase, se permite la separación de las cromátidas hermanas hacia polos opuestos de la célula durante anafase. Una vez distribuidos los cromosomas, en telofase, el huso mitótico se desensambla, los cromosomas se descondensan y, en el caso de células de eucariotas superiores, tiene lugar la reorganización de la envoltura nuclear (5, 8). Tras la citocinesis, el contenido citoplasmático de la célula original se divide entre las células resultado de la duplicación, generándose de este modo finalmente dos células independientes (9). La determinación del plano de división diverge entre distintos organismos. En células animales, el plano de división se establece durante anafase, a través de la posición del huso. En el caso de *S. cerevisiae*, sin embargo, el plano de división se determina al final de G1, antes de la duplicación de los SPBs, y coincide con el cuello de gemación (7, 9).

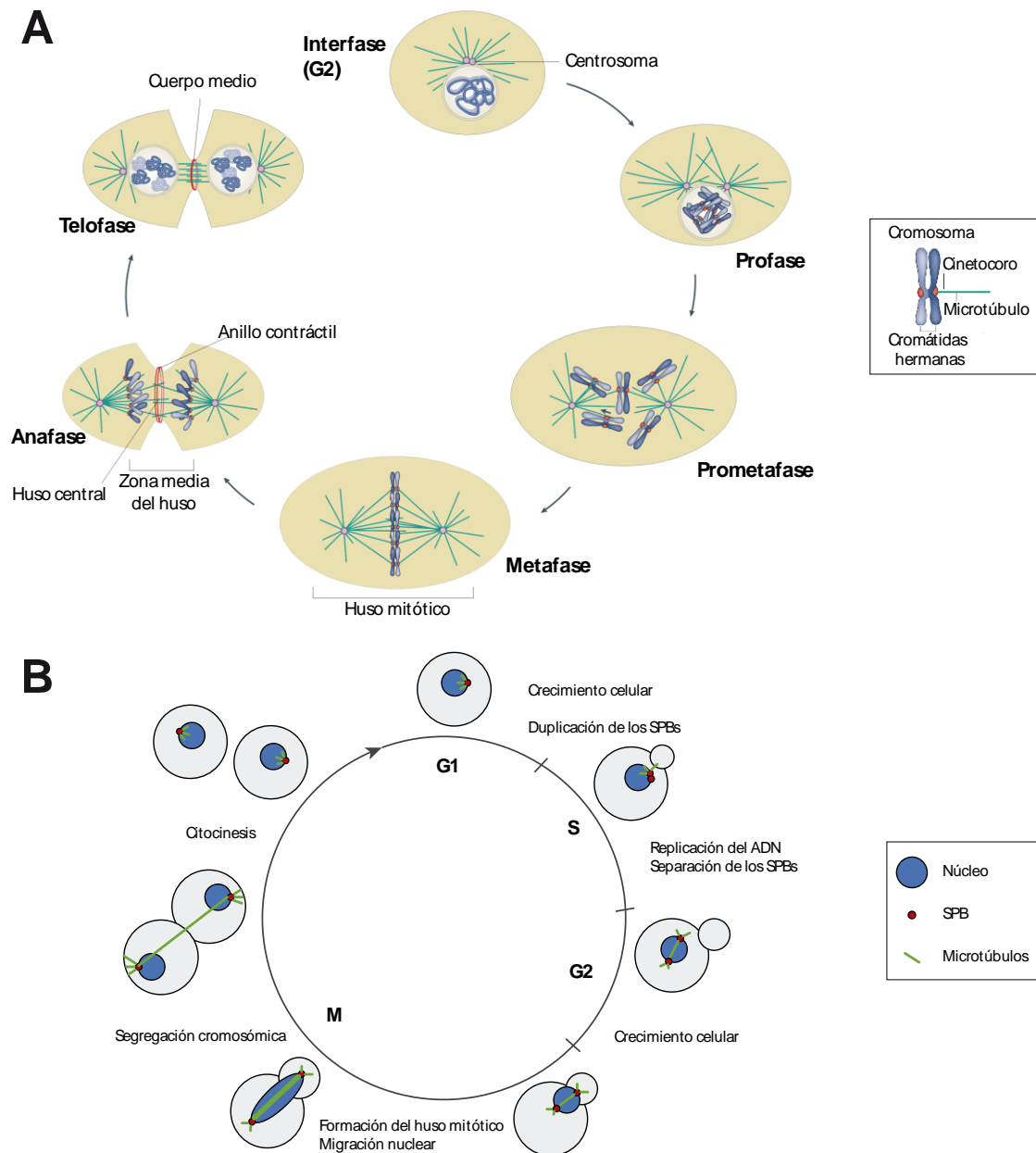


Figura I1. El ciclo celular en células de metazoos (A) y de *Saccharomyces cerevisiae* (B). (A) La cromatina replicada en interfase se condensa durante profase. Posteriormente, los cinetocoros se ensamblan en las regiones centroméricas de los cromosomas. Tras la ruptura de la envuelta nuclear, durante prometafase, los cinetocoros se unen a los microtúbulos del huso. En metafase, los cromosomas se bi-orientan y se alinean en la zona media del huso, formando la placa metafásica. Durante anafase, las cromátidas hermanas se transportan hacia polos opuestos del huso. Subsecuentemente, durante telofase, las masas de ADN se descondensan y la envuelta nuclear se forma de nuevo para generar los dos núcleos de las células hijas. Imagen adaptada de (10). (B) *S. cerevisiae* presenta un patrón de división asimétrico caracterizado por la aparición de una gema que dará lugar a la célula hija como consecuencia del crecimiento polarizado de la célula madre. La replicación del ADN ocurre en la fase S, junto con la duplicación de los SPBs. En la fase M (mitosis) se produce la distribución equitativa de los cromosomas entre la célula madre y la nueva célula hija, sin que ocurra el desensamblaje de la membrana nuclear (mitosis cerrada). La mitosis finaliza cuando la célula madre y la célula hija separan sus citoplasmas a través del cuello de la gemación (citocinesis).

1.2 Regulación de la segregación cromosómica

Durante el proceso de división celular por mitosis, es esencial que la célula hija mantenga el mismo contenido genómico que la célula madre. Para ello, el genoma tiene que ser fielmente duplicado y repartido equitativamente entre las células hijas. Fallos en el reparto del material genético pueden provocar que las células hereden un número incorrecto de cromosomas, y que surjan problemas de aneuploidía, una condición que se caracteriza porque las células portan un número de cromosomas que no es un múltiplo exacto de un contenido genético haploide (11-13).

Para la correcta segregación de los cromosomas es esencial el mantenimiento de la cohesión entre las cromátidas hermanas desde la replicación hasta que se permite su distribución a polos opuestos del huso durante anafase. La segregación cromosómica es mediada por los microtúbulos del huso, que se unen mediante sus extremos (+) a los cinetocoros de los cromosomas (Figura I1A) (11). El cinetocoro es una estructura proteica que posibilita la unión del ADN centromérico al huso mitótico, y sobre la que se aplican las fuerzas generadas por los microtúbulos para permitir el movimiento de los cromosomas (14). El cinetocoro puede dividirse en dos partes: el cinetocoro interno y el externo (10). Las proteínas del cinetocoro interno interactúan con la cromatina centromérica, mientras que las proteínas del cinetocoro externo contribuyen a la unión microtúbulo-cinetocoro (10). Aunque existen contribuciones adicionales de proteínas de unión al ADN o a microtúbulos específicas de especie, los componentes fundamentales del núcleo del cinetocoro están conservados entre eucariotas (14, 15). Así, el cinetocoro interno está formado principalmente por la red CCAN (*Constitutive Centromere-Associated Network*), constituida por las proteínas Cse4/CENP-A, Mif2/CENP-C y Cnn1/CENP-T, mientras que el cinetocoro externo está formado por la red KMN, constituido por Spc105/KNL1 así como por los complejos Ndc80 y Mtw1/Mis12 (Figura I2) (15).

Existen varias posibilidades en relación al establecimiento de uniones microtúbulo-cinetocoro, ya que los cinetocoros de las cromátidas hermanas pueden unirse a microtúbulos que emanan de cualquiera de los polos del huso (Figura I3). Las cromátidas hermanas se bi-orientan cuando cada una de ellas se une a microtúbulos que emanan de un polo opuesto del huso. A las uniones que conducen a la bi-orientación de los cromosomas se les denomina anfitélicas. Entre las uniones mono-orientadas, se encuentran las uniones monotélicas (sólo uno de los cinetocoros del cromosoma está unido a microtúbulos) y las sintélicas (ambas cromátidas hermanas están unidas a microtúbulos del mismo polo del huso). El

número de microtúbulos que se une por cinetocoro varía entre organismos, siendo de sólo uno en el caso de *S. cerevisiae*, aproximadamente tres en *Schizosaccharomyces pombe*, y de hasta alrededor de treinta en las células de mamífero. Por tanto, en la mayoría de los organismos, pueden unirse microtúbulos que emanan del mismo polo a los cinetocoros de ambas cromátidas hermanas, formando uniones merotéticas (11).

Sólo las uniones anfitéticas conducen de forma segura a una segregación correcta de los cromosomas, por lo que las células deben garantizar esta bi-orientación de las cromátidas hermanas antes del inicio de anafase (11). Para ello, las células cuentan con dos mecanismos celulares de vigilancia fundamentales: el punto de control de ensamblaje del huso mitótico (*Spindle Assembly Checkpoint*; SAC), que detecta el estado de unión de los cinetocoros y previene el inicio de anafase hasta que todos los cinetocoros estén unidos a microtúbulos del huso (17), y el mecanismo de corrección de errores, que detecta, desestabiliza y corrige las uniones sintéticas y las merotéticas (18, 19), garantizando la bi-orientación de los cromosomas.

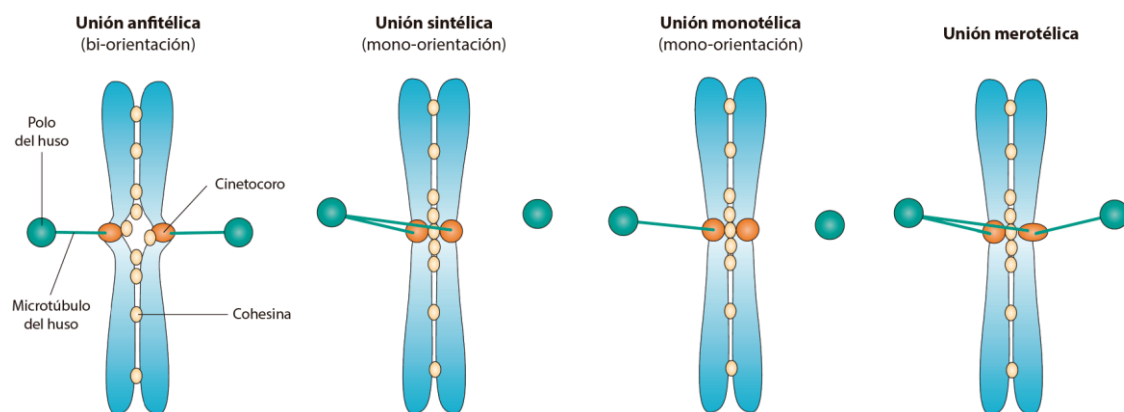


Figura I3. Tipos de unión de los cromosomas al huso. Unión anfitética: cada cromátida hermana está unida a microtúbulos que emanan de polos opuestos del huso. Unión monotética: una de las cromátidas hermanas no está unida a microtúbulos, y la otra permanece unida a microtúbulos de un solo polo del huso. Unión sintética: ambas cromátidas hermanas están unidas a microtúbulos que emanan del mismo polo del huso. Unión merotética: una única cromátida hermana está unida a microtúbulos que emanan de polos opuestos del huso. Imagen adaptada de (20).

1.2.1 Punto de control de ensamblaje del huso (SAC)

La progresión del ciclo celular está estrictamente controlada a través de la degradación de proteínas que actúan como reguladores críticos de las diferentes etapas de la mitosis (21). En 1995, se identificó el complejo promotor de anafase/ciclosoma (*Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*; APC/C), una ligasa E3 de ubiquitina que marca sustratos específicos para su degradación por el proteasoma 26S (22). La actividad APC/C depende de dos cofactores: Cdc20 y Cdh1, que permiten al APC/C seleccionar las dianas específicas para su ubiquitinación. Cdc20 es un activador esencial durante la mitosis, cuando la actividad Cdk1 es alta, mientras que Cdh1 lo es durante la salida de mitosis y en interfase (21, 23).

Durante la entrada en mitosis, APC/C es activado fundamentalmente mediante su unión a Cdc20. Sin embargo, frente a condiciones mitóticas aberrantes, como cuando existen cromátidas no unidas a microtúbulos del huso, la actividad ligasa E3 de APC/C^{Cdc20} es inhibida gracias al SAC, que evita la separación de las cromátidas hermanas y la transición metafase-anafase (24). De forma destacada, la presencia de un único cinetocoro sin unir a microtúbulos (un cinetocoro vacío) produce una señal que es suficiente para bloquear la progresión de la mitosis (25, 26). El SAC está constituido por las quinasas de serina/treonina Mps1 (*Monopolar spindle 1*) y Bub1 (*Budding uninhibited by benzimidazole 1*), así como por una serie de componentes no enzimáticos, entre los que se encuentran Mad1 (*Mitotic arrest deficient 1*), Mad2, Bub3 y la pseudo-quinasa BUBR1 (*BUB1-related*) en humanos o Mad3 en *S. cerevisiae* (la cual, a diferencia de BUBR1, carece del dominio quinasa) (14, 27).

El SAC tiene como diana a Cdc20 (28) y, específicamente, regula de manera negativa la capacidad de este cofactor para activar la poliubiquitinación dependiente del APC/C de dos sustratos claves: la ciclina B (29) y la securina (30), previniendo así la destrucción de estas dos proteínas por el proteasoma 26S (Figura 14) (31). La securina es un inhibidor estequiométrico de una proteasa

conocida como separasa. La separasa se requiere para proteolizar el complejo de cohesinas que mantiene juntas las cromátidas hermanas y permitir que se ejecute, de esta forma, la transición metafase-anafase y la subsecuente separación de los cromosomas. Por otra parte, la proteólisis de la ciclina B inactiva la principal quinasa mitótica, Cdk1, lo cual promueve la salida de mitosis (32). El SAC previene esta cadena de eventos mediante el secuestro de Cdc20, prolongando la metafase hasta que todos los cromosomas se hayan unido correctamente constituyendo la placa metafásica. El SAC es inhibido una vez que se ha logrado la bi-orientación de los cromosomas, tras lo cual las células son liberadas del bloqueo mitótico y se permite la transición metafase-anafase y la salida de mitosis (31, 33, 34).

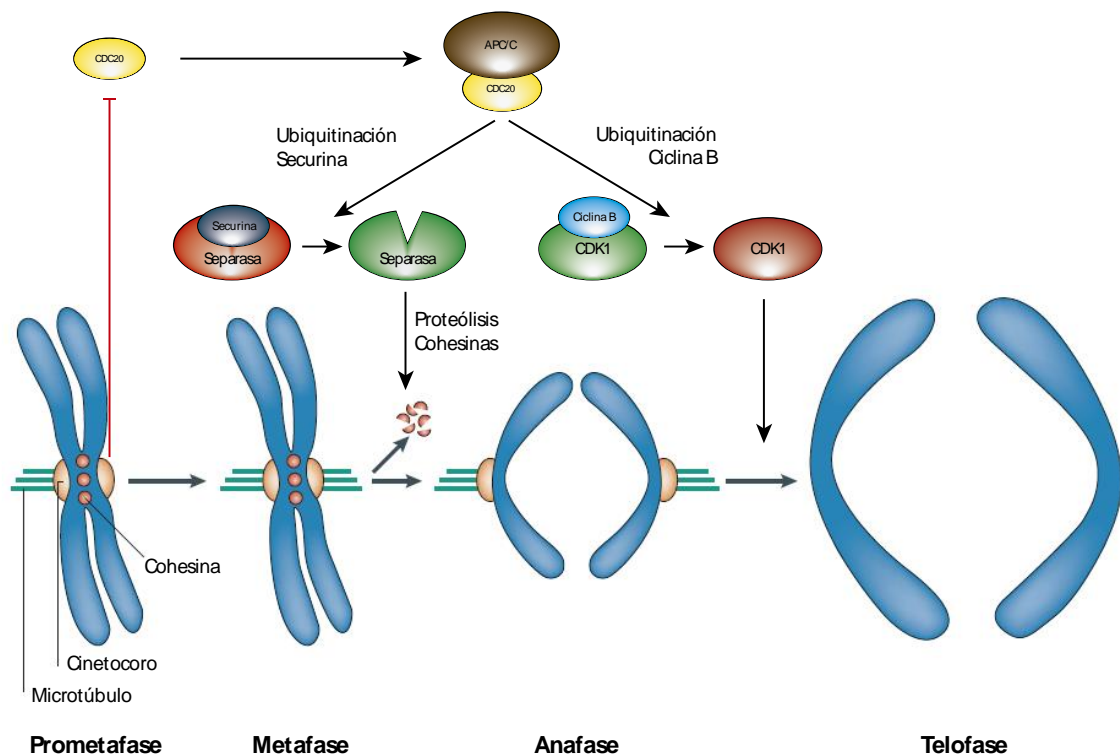


Figura 14. Relación entre el SAC y la maquinaria del ciclo celular. Durante prometáfase, los cinetocoros que no están unidos a microtúbulos activan el SAC, que inhibe la capacidad de Cdc20 para activar al APC/C y, de esta forma, previene la transición metafase-anafase y la salida de mitosis. En metafase, cuando todos los cinetocoros están unidos a microtúbulos, APC/C^{Cdc20} ubiquitina a la securina y la ciclina B, activando a la separasa e inactivando a Cdk1, respectivamente. La separasa entonces corta los complejos de cohesinas que mantienen unidas a las cromátidas hermanas e inicia, consecuentemente, la separación de las mismas. La inactivación de Cdk1, por su parte, conduce a la desfosforilación de los sustratos de Cdk1 por proteínas fosfatasas y, por lo tanto, posibilita la salida de mitosis. Imagen adaptada de (32).

1.2.1.1 Activación del SAC

En respuesta a cinetocoros no unidos a microtúbulos, el SAC cataliza la formación de un complejo inhibitorio de Cdc20 denominado MCC (*Mitotic Checkpoint Complex*), que se comporta como el efector de la ruta e inhibe al APC/C. El MCC es un heterotetrámero que está formado por las proteínas Mad2, Bub3 y Mad3/BUBR1, así como por el propio Cdc20 (Figura I5) (35).

El MCC se ensambla a partir de dos subcomplejos: Cdc20-Mad2 y Mad3/BUBR1-Bub3. Mientras que la formación del subcomplejo Cdc20-Mad2 es catalizada en respuesta a cinetocoros vacíos (no unidos a microtúbulos), el subcomplejo Mad3/BUBR1-Bub3 existe a través de todo el ciclo celular, y su ensamblaje no parece estar regulado (17). El paso clave en la formación del MCC es la activación conformacional de Mad2 desde su forma “abierta” (O-Mad2; sin capacidad de unión a Cdc20) a su forma “cerrada” (C-Mad2; con capacidad de unión a Cdc20). La conversión de Mad2 citosólico desde el estado abierto al cerrado es catalizada por el subcomplejo Mad1-C-Mad2, presente en los cinetocoros vacíos. Este cambio de conformación permite su unión a una molécula de Cdc20, que a su vez genera una ligera modificación conformacional en Mad2 (36). El complejo Cdc20-C-Mad2 resultante se libera del cinetocoro. Tanto el complejo Mad1-C-Mad2 que permanece en el cinetocoro como el complejo Cdc20-C-Mad2 liberado pueden interaccionar con otras moléculas de O-Mad2. Con esto se consigue una retroalimentación positiva que amplifica la señal inhibitoria de anafase rápidamente, al secuestrar a Cdc20 e impedir de esta forma la actividad del APC/C (37, 38). Además, la incorporación de Cdc20 en el MCC promueve su propia ubiquitinación por el APC/C y permite la eliminación del exceso de Cdc20 no inhibido por el SAC (39).

Introducción

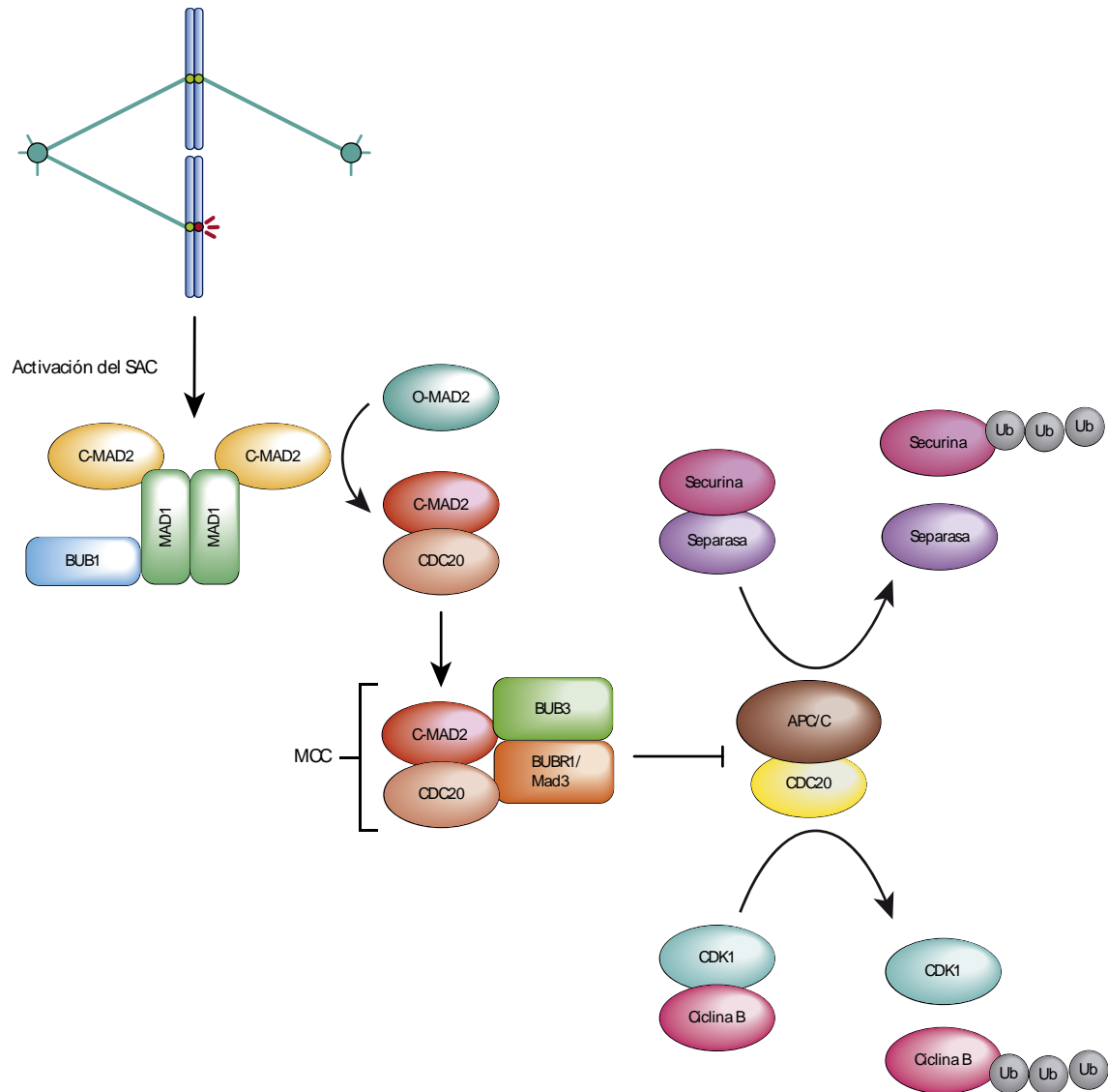


Figura I5. Principios de activación del SAC. Durante las etapas iniciales de la mitosis, los cinetocoros no unidos a microtúbulos del huso catalizan la formación del complejo MCC. C-Mad2, generado a través de la interacción de O-Mad2 con el complejo Mad1-C-Mad2, se une a Cdc20, posiblemente mediante una conformación intermedia y, a continuación, a Mad3/BUBR1-Bub3. El MCC inhibe la actividad de APC/C hasta que todos los cromosomas estén bi-orientados en metafase, impidiendo la poliubiquitinación de la securina y la ciclina B.

Estudios mecánicos y estructurales de la activación de Mad2 en el cinetocoro han proporcionado datos claves sobre las etapas finales de la activación del SAC. Sin embargo, los eventos anteriores, y más concretamente cómo la maquinaria del

punto de control es enviada a los cinetocoros no unidos a microtúbulos, no están del todo esclarecidos. Se sabe que la fosforregulación juega un papel fundamental, y que la contribución de la quinasa Mps1 es esencial para el reclutamiento de todos los demás componentes del SAC al cinetocoro (14). En concreto, la fosforilación de Spc105/KNL1 (una proteína de la red KMN, presente en el cinetocoro externo) por Mps1 crea un sitio de acoplamiento para Bub1 y Bub3 (40). La localización de Bub1 en el cinetocoro es necesaria y suficiente para atraer a Bub3 y Mad3/BUBR1, así como a MAD1, aunque el mecanismo molecular está menos definido (14). En células humanas, MAD1 podría requerir un receptor adicional. Un candidato es el complejo RZZ (Rod-Zwilch-Zw10), presente principalmente en metazoos (41), y cuya localización depende de Aurora B y MPS1 (42, 43). En *S. cerevisiae*, se ha demostrado que Bub1 es fosforilada por Mps1 para reclutar e interaccionar con Mad1 (44). Además, Mad2 podría funcionar como co-receptor ya que se requiere para la localización de Mad1, al contrario de lo que sucede en otros organismos (11).

1.2.1.2 Silenciamiento del SAC

Considerando que la activación del SAC en el cinetocoro es dependiente de fosforilación, es razonable suponer que la actividad de una fosfatasa sea esencial en el silenciamiento de este punto de control. Entre los componentes del SAC, la quinasa Mps1/MPS1 fosforila a Spc105/KNL1 para promover el reclutamiento de las demás proteínas (11, 40). La fosfatasa PP1 es reclutada al cinetocoro mediante su interacción con Spc105/KNL1 (45, 46). En *S. cerevisiae*, PP1 ejerce un papel fundamental en la inhibición del SAC, revirtiendo la fosforilación mediada por Mps1 para liberar a Bub1-Bub3 y la fosforilación de sustratos de Ipl1 para estabilizar las uniones microtúbulo-cinetocoro correctas (40, 45, 47, 48). En células de mamífero, la fosfatasa que contrarresta la fosforilación por MPS1 de KNL1 es PP2A-B56, que se asocia a BUBR1 (49). Esta fosfatasa adicionalmente se opone, junto con PP1, a la función de Aurora B en el cinetocoro (46, 50-52). Estos

resultados sugieren que la red KMN, y Spc105/KNL1 en particular, actúan tanto en la activación del SAC como en la extinción de la señal generada por el mismo (14).

En células humanas, la dineína contribuye de manera importante al silenciamiento del SAC, transportando a los componentes de este punto de control desde los cinetocoros hacia los extremos (-) de los microtúbulos (14). Si bien está claro que MAD1, MAD2 y Spindly (proteína que se requiere para la unión de la dineína a los cinetocoros) son transportados por la dineína (53, 54), existen datos contradictorios con respecto a BUB1, BUB3 y BUBR1 (53, 55, 56). Recientemente, se ha demostrado que incluso las proteínas HEC1 y MIS12 de la red KMN son transportadas hacia los polos del huso mediante la dineína (56). Sin embargo, este proceso puede que no sea el principal en el bloqueo de la producción de complejos MCC cuando se satisface el SAC. La depleción de la proteína Spindly o de la dineína no retiene a las proteínas del SAC en los cinetocoros y, además, la dineína cinetocórica no está conservada entre todos los eucariotas (57).

Otro posible mecanismo de silenciamiento del SAC es el desplazamiento directo del complejo Mad1-C-Mad2 de los cinetocoros tras la unión de los microtúbulos, posiblemente por un impedimento estérico (11, 58). Sin embargo, la actividad Mps1 promueve la localización de Mad1 en el cinetocoro a pesar de que el cromosoma esté unido a microtúbulos o bi-orientado (59). Por lo tanto, de existir este mecanismo, sería redundante o suprimido en estas condiciones (11).

Finalmente, el silenciamiento del SAC en los cinetocoros debe estar integrado con la liberación de Cdc20 de sus inhibidores Mad2, Bub3 y Mad3/BUBR1 y la activación del APC/C (17). La ubiquitinación dependiente del APC/C de Cdc20 tiene un papel conservado en el desensamblaje de los complejos MCC. Además, en metazoos, la proteína p31^{comet}, que se une a C-MAD2, promueve tanto el desensamblaje como la ubiquitinación de CDC20 (60-63). Junto con la liberación del cofactor Cdc20 del MCC, en el proceso de activación del APC/C está implicada la fosforilación de varias de sus subunidades de forma dependiente del complejo Cdk1-Ciclina B. De hecho, en *S. cerevisiae*, se ha demostrado que la fosforilación

dependiente de Cdk1-Clb2 determina qué activador puede unirse al APC/C, de forma que Cdc20 se une en mitosis y Cdh1 en la salida de mitosis e interfase (23).

1.2.2 Aurora B y el Complejo Pasajero del Cromosoma (CPC)

Aunque existe una ligera tendencia hacia la bi-orientación debido a las propias limitaciones geométricas impuestas por la estructura cromosómica (64, 65), los errores en las uniones microtúbulo-cinetocoro son frecuentes (66, 67) y, de no corregirse, conducen a un reparto no equitativo de los cromosomas durante la división celular. Inicialmente, los cinetocoros pueden unirse a microtúbulos en cualquier configuración, alcanzando finalmente el estado de unión correcta en un proceso de ensayo-error, en el que cada desestabilización proporciona a la célula una nueva oportunidad para la bi-orientación (68).

Una cuestión clave para entender el proceso de corrección de errores es cómo la célula distingue las uniones correctas de las incorrectas. Los experimentos clásicos de micromanipulación llevados a cabo por Nicklas en espermatozoides de insectos proporcionaron evidencias experimentales directas de que las uniones correctas son estabilizadas debido a la tensión que se genera en el centrómero cuando los microtúbulos del huso empujan a los cinetocoros bi-orientados en sentidos opuestos (69). Un descubrimiento esencial para la comprensión del mecanismo de corrección de errores fue conocer que, en *S. cerevisiae*, la quinasa Ipl1, al igual que su homólogo Aurora B en metazoos, es capaz de eliminar las uniones microtúbulo-cinetocoro que no conducen a tensión en el huso (70-74). Esto demostró que el Complejo Pasajero del Cromosoma (CPC), del que Ipl1/Aurora B es la subunidad enzimática (75), funciona como el efector en la ruta propuesta por Nicklas.

1.2.2.1 Composición del CPC

El CPC está compuesto por una subunidad enzimática, Ipl1/Aurora B, y tres subunidades regulatorias no enzimáticas necesarias para la estabilidad, localización y función del complejo. Las subunidades no enzimáticas son Sli15/INCENP, Bir1/Survivina y Nbl1/Borealina (Figura I6) (76). El CPC consiste en dos módulos funcionalmente distintos: un módulo catalítico o módulo quinasa y un módulo de localización. En humanos, el módulo catalítico está compuesto por Aurora B y un segmento de 50 residuos en el extremo C-terminal de INCENP (IN-box), mientras que el módulo de localización está constituido por un segmento de 45 residuos del extremo N-terminal de INCENP, Survivina y Borealina, con una conformación de triple hélice. Los dos módulos están conectados por la parte central de INCENP (77). La estructura del CPC en *S. cerevisiae* es similar a la descrita anteriormente para el complejo humano (78, 79).

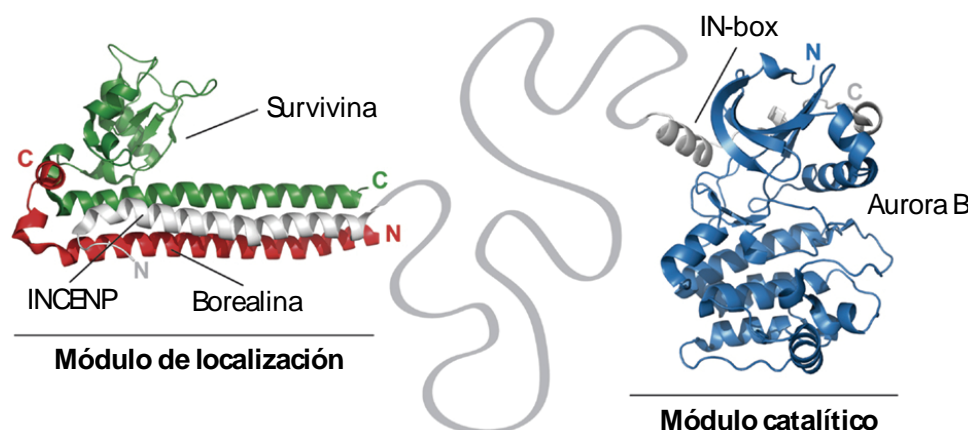


Figura I6. Estructura del CPC humano. Se muestra el módulo de localización, formado por una triple hélice de INCENP, Borealina y Survivina, así como el módulo catalítico, formado por Aurora B y el IN-box de INCENP, unidos mediante la parte central de INCENP. Imagen adaptada de (77).

En células de mamífero, Aurora B parece participar en, al menos, dos complejos diferentes: un holocomplejo formado por Aurora B-INCENP-Survivina-Borealina y un subcomplejo formado por Aurora B-INCENP. El subcomplejo podría estar

implicado en la fosforilación de la histona H3, mientras que el holocomplejo sería el responsable de la bi-orientación de los cromosomas, el ensamblaje del huso mitótico y el control de la citocinesis (80).

1.2.2.1.1 Aurora B

Aurora B pertenece a una familia altamente conservada de proteínas quinasas de serina/treonina (81), que fue descubierta por primera vez en *D. melanogaster* (82). Junto con las quinasas de las familias CDK (*Cyclin-Dependent Kinase*) y PLK (*Polo-Like Kinase*), las quinasas de la familia Aurora coordinan la división celular mitótica y meiótica (76). En vertebrados, esta familia está compuesta por tres miembros: Aurora A, implicada en la maduración y la separación de los centrosomas y en el establecimiento de la bipolaridad del huso; Aurora B, implicada en la regulación de la segregación cromosómica, en la cohesión de las cromátidas hermanas, en la estabilidad del huso y en la citocinesis; y Aurora C, con un alto parecido a Aurora B, pero que se expresa principalmente en los testículos (83). Se ha demostrado que Aurora C es una proteína pasajera del cromosoma, con funciones similares y solapantes a las de Aurora B, y que también interacciona con INCENP. De esta forma, la sobreexpresión de Aurora C puede deslocalizar a Aurora B, y viceversa (84). En *S. cerevisiae*, Ipl1 es la única quinasa de la familia Aurora y se considera el homólogo funcional de Aurora B (75).

La activación de Ipl1/Aurora B se consigue mediante múltiples pasos regulatorios. En células humanas, se ha demostrado que la activación completa de Aurora B requiere la unión al IN-box de INCENP, la fosforilación mediada por Aurora B del motivo TSS (Thr-Ser-Ser) del IN-box y la autofosforilación de Aurora B en la treonina 232 (85-87). Estas reacciones de fosforilación probablemente ocurran en *trans*; de hecho, son sensibles a concentraciones locales altas del CPC (77). Aparte de los mecanismos intrínsecos de regulación nombrados, el CPC también puede ser controlado por mecanismos extrínsecos, y se ha implicado a las quinasas

Cdc28/CDK1, Mps1/MPS1, PLK1 y CHK1 (quinasa implicada en el punto de control de daños en el ADN) en la activación catalítica de Ipl1/Aurora B en los cinetocoros (77, 88-90). Finalmente, en células de eucariotas superiores, se ha sugerido que la proteína TD-60 (*Telophase Disk-60*), descrita originalmente como un posible factor de intercambio de nucleótidos (91, 92), coopera en la activación de Aurora quinasa B (93, 94). Aunque actualmente no se considera a TD-60 un miembro del núcleo del complejo CPC, tiene una localización típica de una proteína pasajera del cromosoma, y se deslocaliza cuando se afecta a otros componentes del CPC (93, 94).

Para el control de la actividad de Aurora B y del balance de fosforilación/desfosforilación de sus sustratos, también es esencial la presencia de reguladores negativos de la actividad Aurora B. En concreto, la interacción de PP1 (Proteína fosfatasa 1) con Spc105/KNL1 se requiere para desfosforilar los sustratos de Ipl1/Aurora B en los cinetocoros con el fin de estabilizar las uniones con los microtúbulos (95). Aunque PP1 se ha propuesto como la fosfatasa fundamental para contrarrestar la acción del CPC, en células humanas, también es clave la participación de BUBR1 y PP2A-B56 (46, 52). Puesto que Aurora B se requiere tanto para la fosforilación como para la localización de la pseudo-quinasa BUBR1 en el cinetocoro, esta proteína podría actuar como parte de un mecanismo de retroalimentación negativa de Aurora B, ya que BUBR1 recluta a PP2A-B56 al cinetocoro (88).

1.2.2.1.2 INCENP

Slh15/INCENP es la plataforma sobre la que se ensambla el CPC (75). Fue descubierta en una búsqueda de anticuerpos monoclonales para nuevos componentes del andamiaje de los cromosomas mitóticos (96). En la proteína humana, los residuos 1-58 forman una triple hélice junto a Borealina y Survivina que se requiere para la localización del CPC en los centrómeros, en la zona media

del huso en anafase y en el cuerpo medio (estructura transitoria que conecta las dos células hijas al final de la citocinesis (97)) (76, 98). INCENP también se une a HP1, y esta interacción es importante para la localización del CPC durante interfase (76). En *S. cerevisiae*, Sli15 tiene un sitio potencial de unión a HP1, aunque este organismo carece de un homólogo de dicha proteína (99). El extremo C-terminal de INCENP, denominado IN-box, altamente conservado desde *S. cerevisiae* hasta mamíferos, está implicado en la unión y regulación de Aurora B (100).

Sli15/INCENP se regula por Ipl1/Aurora B y el complejo Cdc28/CDK1-ciclina (86, 101). En eucariotas superiores, CDK1 fosforila a INCENP para regular tanto la actividad quinasa del CPC como la localización, inhibiendo su translocación a la zona media del huso hasta anafase (102, 103). En *S. cerevisiae*, la fosforilación de Sli15 por Cdc28 e Ipl1 evita la asociación del CPC con la zona media del huso antes de anafase. Además, Cdc28 también fosforila seis residuos en Sli15 que son necesarios para la activación del SAC. La desfosforilación de estos sitios al inicio de anafase es necesaria para prevenir la reactivación del SAC cuando las cromátidas hermanas son separadas y sus cinetocoros no están bajo tensión (104-107).

Originalmente, se pensaba que INCENP era exclusivamente una subunidad implicada en la localización y regulación de Aurora B, como TPX2 lo es para Aurora A. Sin embargo, INCENP tiene una función independiente de Aurora B en la regulación de la progresión mitótica. Concretamente, INCENP es fosforilada por CDK1 para el reclutamiento de PLK1 a los cinetocoros, proceso en el que Aurora B no es necesaria. Esta nueva función une a CDK1 y PLK1, y se considera el cruce donde convergen las tres principales familias de quinasas implicadas en la mitosis. (101).

1.2.2.1.3 Survivina

Bir1/Survivina se describió originalmente como una proteína inhibidora de apoptosis (IAP) que se acumula en G2, y se propuso como un regulador negativo de la muerte celular en mitosis (108). La proteína se compone de un dominio BIR (*Baculovirus IAP Repeat*; dominio globular coordinado con Zn^{2+} e implicado en interacciones proteína-proteína) en el extremo N-terminal y una extensión helicoidal en el extremo C-terminal (Figura I6) (76). Survivina tiene además una señal de exporte nuclear. Se ha sugerido que, en el citoplasma, esta proteína puede inhibir la muerte celular, mientras que en el núcleo o unida al CPC regula la mitosis (109, 110). En *S. cerevisiae*, Bir1 es mucho más grande que su homólogo en metazoos y muestra poca conservación de secuencia aparte del dominio BIR, sin embargo, esta región no es esencial en levaduras (111).

Survivina también es regulada por modificaciones post-traduccionales como fosforilación por Aurora B, CDK1, PLK1 y caseína quinasa 2, o ubiquitinación y sumoilación (76).

1.2.2.1.4 Borealina

Nbl1/Borealina se descubrió por primera vez en un estudio proteómico para identificar nuevos componentes de andamiaje del cromosoma mitótico y, simultáneamente, en una búsqueda de nuevas proteínas de unión a cromosomas en *Xenopus laevis* (75). El extremo N-terminal de Borealina participa en la triple hélice que constituye el módulo de localización del CPC (Figura I6) (112). El homólogo de levadura, Nbl1, es muy pequeño en comparación con el equivalente de vertebrados, aunque mantiene la región implicada en la triple hélice, lo que sugiere que se trata de una función conservada en la evolución (76).

Al igual que otros miembros del CPC, Borealina se regula post-traduccionamente mediante sumoilación y fosforilación por Aurora B, MPS1 y CDK1. Estas modificaciones son importantes tanto para el control del direccionamiento del CPC a los centrómeros como para la actividad del complejo (75, 76).

1.2.2.2 Distribución y localización del CPC durante mitosis

El nombre de Complejo Pasajero del Cromosoma refleja su localización dinámica durante la mitosis (113). El patrón específico de localización del complejo se correlaciona con las distintas funciones que el CPC desempeña durante la división celular (Figura I7) (114). Así, el CPC se detecta inicialmente a lo largo de los brazos de los cromosomas, donde participa en la regulación de la estructura y la condensación de los mismos, pero se concentra progresivamente a través de prometafase y metafase en la zona interna de los centrómeros. En esta localización, el CPC desempeña su función más caracterizada y mejor conocida: el control de la segregación cromosómica. En metafase tardía o anafase temprana, el CPC se transfiere a la zona media del huso, y más concretamente al huso central (estructura en el centro de la zona media del huso en la que interdigitan los extremos (+) de los microtúbulos (115)), donde es esencial para su ensamblaje y estabilidad. Al final de anafase, el complejo se transloca hasta el córtex celular ecuatorial (región de la membrana celular donde se ensamblan las fibras de actina y miosina para formar el anillo contráctil (75)). En telofase, el CPC se concentra en el anillo de ingresión y, subsecuentemente, en el cuerpo medio (estructura densa que se deriva del huso central durante telofase tardía y está presente en el puente intercelular durante citocinesis (75)). En estas últimas fases, el complejo es esencial para la abscisión y la coordinación entre la segregación de los cromosomas y el reensamblaje de la envuelta nuclear (75, 116, 117).

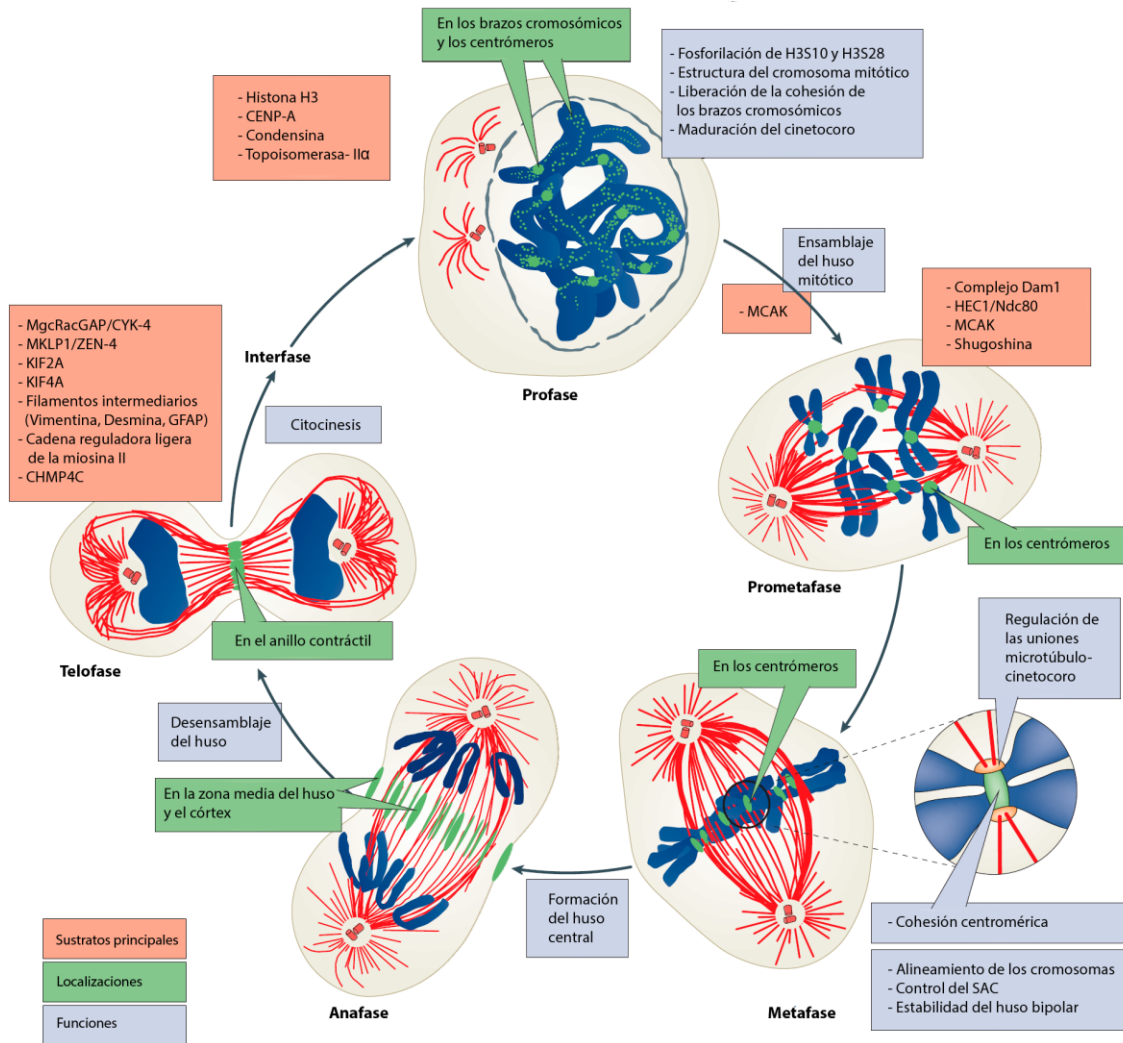


Figura 17. Localización y función del CPC durante la mitosis. En profase, el CPC se encuentra en los brazos de los cromosomas, donde fosforila la serina 10 y la serina 28 de la histona H3. El CPC está implicado en la liberación de la cohesión de los brazos de los cromosomas y en su estructura. Durante esta fase, el complejo se empieza a acumular en los centrómeros, donde promueve la maduración de los cinetocoros, y se mantiene en esta localización a través de prometafase. El CPC se requiere para la formación de un huso bipolar y su estabilidad desde profase/prometafase hasta anafase. En metafase, aún en los centrómeros, el complejo juega un papel principal en cohesión, en la regulación de las uniones microtúbulo-cinetocoro, en el alineamiento correcto de los cromosomas a lo largo del ecuador del huso y en el SAC. En anafase, el CPC se transloca a la zona media del huso y aparece en el córtex celular, donde está implicado en el ensamblaje y estabilidad del huso central. En telofase, el CPC se concentra en el anillo contráctil y, posteriormente, en el cuerpo medio, donde se requiere para terminar la citocinesis. Imagen adaptada de (75).

De manera interesante, una única mutación puntual en Aurora A (G198N) cambia su preferencia de unión por TPX2 a una mayor afinidad por INCENP y rescata la pérdida de función de Aurora B en cuanto al alineamiento de los cromosomas y el punto de control de ensamblaje del huso (100). Esto subraya que la especificidad de sustrato de Aurora A y Aurora B viene predominantemente dictada por la localización específica de dichas quinasas, destacando la importancia de la función de las subunidades no-enzimáticas del CPC en la activación y localización de la quinasa.

1.2.2.3 Reparación de uniones microtúbulo-cinetocoro incorrectas por el CPC

1.2.2.3.1 Localización y activación del CPC en el centrómero

El módulo de localización dirige al CPC al centrómero, donde se localiza la mayor parte de este complejo durante la mitosis (77). La fosforilación de INCENP por CDK1 podría ser el paso principal para el reclutamiento del CPC a los cinetocoros, a través de su interacción con proteínas no identificadas, posiblemente dentro de la red CCAN del cinetocoro interno (77). En esta estructura, Aurora B contribuye, junto con MPS1, a la localización de BUB1, que fosforila la treonina 120 de la histona H2A (H2A-T120-P) (118-120). H2A-T120-P promueve el reclutamiento de proteínas shugoshina (SGO1 y SGO2 en humanos). SGO1 y SGO2 pueden unirse a Borealina fosforilada por CDK1, contribuyendo a la localización del CPC en los centrómeros (118, 121). Las proteínas shugoshina, adicionalmente, controlan el reclutamiento de proteínas fundamentales en la corrección de errores, incluyendo MCAK (microtúbulo-despolimerasa y sustrato de Aurora B) y el complejo fosfatasa PP2A-B56, que equilibra la abundancia y actividad del CPC y PLK1 (77). Se ha sugerido que, en *S. cerevisiae*, Sgo1 también podría tener un papel directo en el reclutamiento del CPC a los centrómeros (122). Además, en células humanas, para la localización del CPC en los centrómeros es crucial la actividad de la quinasa Haspin, fundamentalmente mitótica, que, a su vez, es activada por Aurora B (123).

Haspin fosforila la treonina 3 de la histona H3 (H3-T3-P), y esta marca histónica es reconocida por Survivina para la localización centromérica del complejo (124). En *S. cerevisiae*, recientemente se ha demostrado que Ipl1 se direcciona al centrómero también mediante la fosforilación de la treonina 3 de la histona H3 (125). Adicionalmente, en dicho organismo modelo, se ha demostrado que el homólogo de Survivina, Bir1, interacciona con Ndc10, una subunidad del complejo centromérico CBF3 (126, 127).

1.2.2.3.2 Regulación de uniones microtúbulo-cinetocoro mediante el modelo de separación espacial

La localización de Ipl1/Aurora B en el centrómero durante metafase (en la zona media entre los cinetocoros de las cromátidas hermanas) es la base para la regulación de la bi-orientación de los cromosomas según el modelo de separación espacial. Este modelo, que explica cómo Ipl1/Aurora B desestabiliza específicamente las uniones microtúbulo-cinetocoro incorrectas, propone que, más que por cambios intrínsecos en la actividad quinasa de Ipl1/Aurora B, la reparación de uniones incorrectas de los cromosomas al huso es posible gracias a la localización relativa de esta quinasa con respecto a sus sustratos en el cinetocoro externo (68). Los cinetocoros de cromátidas hermanas no bi-orientadas están lo suficientemente cerca del centrómero como para ser fosforilados por Ipl1/Aurora B. La fuerza ejercida por los microtúbulos en los cinetocoros bi-orientados genera tensión en las uniones microtúbulo-cinetocoro, y distancia Ipl1/Aurora B (centromérica) de sus sustratos en los cinetocoros, imposibilitando así su fosforilación (Figura I8) (128).

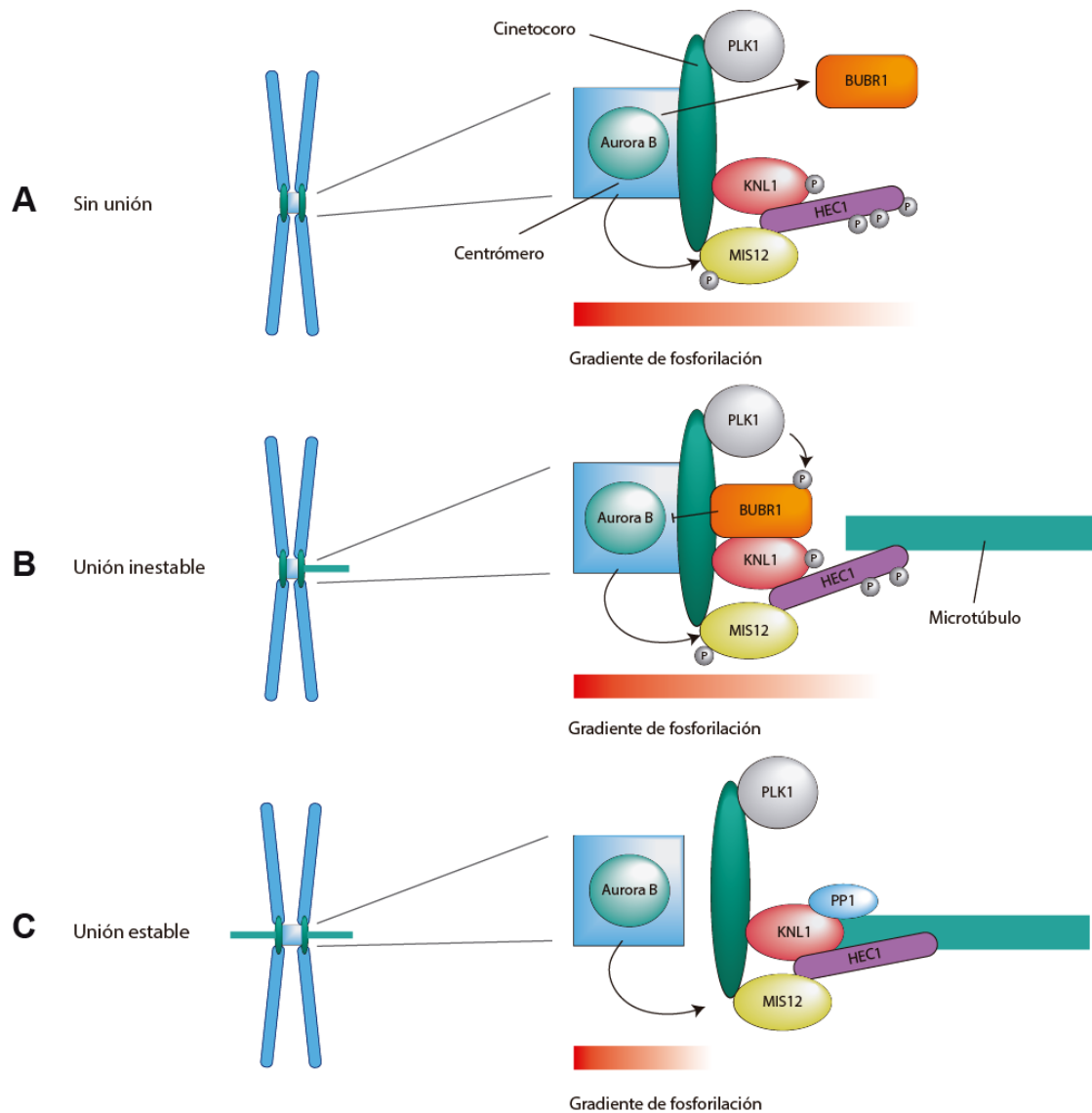


Figura I8. Modelo de separación espacial de corrección de uniones microtúbulo-cinetocoro por Aurora B. En este modelo, la afinidad de unión a microtúbulos del cinetocoro está afectada por un gradiente de fosforilación generado por Aurora B. Por otro lado, la red KMN (KNL1-Mis12-Ndc80) actúa como el componente principal en las uniones microtúbulo-cinetocoro. **(A)** En profase, Aurora B, presente en el centrómero, está próxima al cinetocoro debido a la falta de tensión en el huso. En este escenario, el gradiente de fosforilación de Aurora B es máximo y puede fosforilar todos los componentes de la red KMN; en consecuencia, el cinetocoro tiene la afinidad más baja por los microtúbulos. **(B)** Aurora B recluta a BUBR1 al cinetocoro, donde es fosforilada por PLK1, y esto resulta en una reducción de actividad quinasa Aurora B. De este modo, se genera un gradiente de fosforilación menor y, en consecuencia, los microtúbulos pueden unirse transitoriamente a los cinetocoros. **(C)** Cuando las cromátidas se bi-orientan se genera tensión, y la quinasa es alejada de sus sustratos en los cinetocoros. En base a esta restricción espacial y al posterior reclutamiento de PP1, que desfosforila los sustratos de la red KMN, el gradiente de fosforilación establecido por Aurora B es mínimo y los microtúbulos se pueden unir establemente a los cinetocoros (129).

Existen numerosas evidencias que apoyan el modelo de separación espacial. Así, el nivel de fosforilación de los sustratos de Ipl1/Aurora B está fuertemente relacionado con su posición dentro del cinetocoro (Figura 18). De esta forma, Ndc80/HEC1, localizado en la periferia del cinetocoro externo, presenta variaciones en su grado de fosforilación en respuesta a la tensión generada debido a la bi-orientación de las cromátidas hermanas, a diferencia de otros sustratos más cercanos al cinetocoro interno, como la subunidad Dsn1 del complejo Mis12 (130). Por otro lado, si Aurora B se envía artificialmente a la región externa del cinetocoro, las proteínas del cinetocoro se fosforilan constitutivamente, de manera independiente de la tensión, y las uniones microtúbulo-cinetocoro no pueden estabilizarse (74).

Como se ha indicado, Aurora B se encarga de desestabilizar las uniones microtúbulo-cinetocoro incorrectas. Así, la fosforilación de Ndc80/HEC1 y KNL1 reduce fuertemente su capacidad de unión a microtúbulos, probablemente mediante la introducción de cargas negativas que impiden la interacción con los microtúbulos también negativamente cargados (68). La fosforilación de Dsn1 del complejo Mis12 también tiene un efecto negativo en la actividad de unión a microtúbulos del cinetocoro (130). Sin embargo, en este caso, la regulación parece ocurrir a través de un cambio alostérico en Dsn1 que modula la conformación mediante la que KNL1 y el complejo Ndc80 interaccionan con los microtúbulos, ya que el complejo Mis12 por sí sólo no muestra actividad directa de unión a microtúbulos (68).

Adicionalmente, Aurora B también regula otras proteínas cinetocóricas que cooperan con la red KMN para unir microtúbulos (76). En *S. cerevisiae*, la fosforilación del complejo Dam1/DASH por Ipl1 juega un papel fundamental en el establecimiento de la bi-orientación cromosómica (131). Dicho complejo se carga en los cinetocoros sólo después de su unión a los microtúbulos, y esta unión es dependiente de su interacción con Ndc80 (132). Aunque se ha demostrado que la fosforilación de Dam1 altera su afinidad de unión a los microtúbulos, los sitios probados de fosforilación de Dam1 no se encuentran en su dominio de unión a

microtúbulos (133). En cambio, Ipl1 regula negativamente la interacción de Dam1 con Ndc80, y ambos complejos constituyen las dianas principales del CPC para la corrección de errores en levaduras (134-136). En células animales, no se ha identificado el ortólogo del complejo Dam1, habiéndose propuesto al complejo SKA como análogo funcional (137). Dicho complejo se localiza en el cinetocoro externo de manera dependiente de Ndc80 (138). SKA también es regulado negativamente mediante su fosforilación por parte de Aurora B (139). Además, se ha demostrado recientemente que el complejo SKA recluta a PP1 a los cinetocoros, por lo que podría desempeñar un papel clave en el silenciamiento del punto de control de ensamblaje del huso (140). Por otra parte, en metazoos, además de los sustratos cinetocóricos, Aurora B fosforila a MCAK y KIF2A durante la reparación de las uniones microtúbulo-cinetocoro erróneas, lo cual tiene un efecto negativo sobre la actividad despolimerizadora de microtúbulos (141, 142).

Se ha propuesto que las proteínas fosfatasa asociadas a cinetocoros PP1 y PP2A contrarrestan la actividad Aurora B para facilitar la estabilización de las uniones microtúbulo-cinetocoro (76). KNL1 media el reclutamiento a los cinetocoros de PP1 (directamente) y PP2A (indirectamente, a través de la interacción de BUBR1 con la subunidad reguladora B56), así como de las proteínas del SAC BUBR1 y BUB1, que inhiben la actividad quinasa y promueven la localización de Aurora B, respectivamente (46, 50-52, 143, 144). En *S. cerevisiae*, la unión de Glc7 (el homólogo de PP1 en levaduras) a Spc105 contribuye al silenciamiento del punto de control de ensamblaje del huso, y dicha unión es debilitada mediante la fosforilación de Spc105 por Ipl1 (45, 46, 145). La desfosforilación de los sustratos asociados al cinetocoro esencial para la estabilización de las uniones bi-orientadas (146).

1.3 Otras funciones del Complejo Pasajero del Cromosoma

1.3.1 Condensación y estructura del cromosoma mitótico

Durante la división celular eucariota, la cromatina nuclear sufre cambios drásticos en su estructura y grado de compactación. Aunque ya en interfase la cromatina se encuentra significativamente compactada, durante la entrada en mitosis se condensa aún más, formando cromosomas individuales para facilitar su captura y el transporte por el huso mitótico (147). La condensación cromosómica empieza en profase gracias a la actividad Cdk1-ciclina B nuclear, y debe mantenerse durante todo el ciclo para favorecer el transporte y la segregación de los cromosomas (148). Hasta el momento, se conoce poco sobre cómo se mantiene la condensación de la cromatina durante anafase después de la inactivación de Cdk1 y cómo se induce la descondensación. El mantenimiento en estado inactivo de las fosfatasa que se contraponen a la actividad Cdk1 podría explicar que la condensación se pueda conservar a través de anafase, aunque se ha sugerido que la regulación de este proceso presenta una mayor complejidad (149).

Aurora B se ha relacionado con la condensación de los cromosomas en mitosis temprana, pero su implicación en este proceso aún no está clara. Esta quinasa se asocia con los cromosomas en profase, donde fosforila la serina 10 y la serina 28 de la histona H3 (150). La fosforilación de la histona H3 en la serina 10 se ha correlacionado con el estado de condensación cromosómica, pero no parece ser esencial para la condensación general de la cromatina (75, 151). En metazoos, esta marca histónica puede regular negativamente la unión de la proteína HP1 (implicada en la formación de heterocromatina en células en interfase) a la lisina 9 trimetilada adyacente, puesto que la fuerte fosforilación de la serina 10 de la histona H3 puede impedir dicha interacción (75, 152). Aunque la mayoría de HP1 es desplazada de los brazos cromosómicos durante la mitosis, permanece en los centrómeros, donde juega un papel crucial en la cohesión de las cromátidas hermanas y participa en el reclutamiento del CPC a los centrómeros debido a su interacción con Borealina (153). Por otra parte, la asociación de las condensinas

(complejo proteico conservado necesario para la condensación de los cromosomas y su segregación (154)) con la cromatina nuclear es gobernada por la localización y actividad de Aurora B. Ahora bien, su acción parece estar más relacionada con la arquitectura de la cromatina que con el estado de compactación de la misma antes de anafase (149, 155). A pesar de que la inhibición de Aurora B no afecta a la condensación de la cromatina en general, sí provoca una descondensación prematura durante la salida de mitosis. Así, la quinasa se convierte en crítica para el mantenimiento del grado de compactación tras la inactivación de Cdk1 (149, 156). Cabe destacar que, aunque el CPC es eliminado de los cromosomas al inicio de anafase y se concentra en la zona media del huso, se establece un gradiente de fosforilación de Aurora B a lo largo del huso que se expande desde la zona media hasta donde se encuentran los cromosomas durante su segregación, coincidiendo con un máximo en la deposición de las condensinas (155, 157).

Se han descrito varias fosfatasas implicadas en restablecer la morfología de interfase tras la mitosis (155). Así, se ha demostrado que tanto PP1 como PP2A están relacionadas con este proceso (158). De hecho, se ha comprobado que PP1 antagoniza a Aurora B en varios sistemas, ya que desfosforila la histona H3 y revierte la autofosforilación de Aurora B que se requiere para su actividad (150, 159, 160). En *S. cerevisiae*, la actividad de la fosfatasa Cdc14 impide la asociación de Brn1 (subunidad del complejo de condensinas) con la cromatina (161), sugiriendo que su actividad fosfatasa promueve la descondensación durante la salida de mitosis. La relocalización del CPC desde los cromosomas hasta el ecuador celular es, en este sentido, importante para la descondensación eficiente de los cromosomas, no sólo por la reversión por parte de PP1 (y probablemente PP2A) de la fosforilación de las condensinas, sino también por la prevención de la re-fosforilación por parte de Aurora B de sus sustratos en los brazos cromosómicos en anafase (155).

Actualmente, además de las fosfatasas que antagonizan a Aurora B, se han propuesto otros mecanismos para la inactivación de Aurora B durante la salida de mitosis (149). En células somáticas, Aurora B es degradada al final de la mitosis

mediante el complejo APC/C^{Cdh1} (162, 163). En otros tipos celulares, Aurora B no es degradada, y existen formas adicionales de regular la descondensación de la cromatina, como los sistemas dependientes de ubiquitina (156). Durante la salida de mitosis, se ha sugerido que Cdc48/p97 (chaperona dependiente de ubiquitina implicada tanto en el control de calidad de proteínas como en procesos de señalización celular (164)), a través de su proteína reguladora Ufd1-Npl4, se une a Aurora B ubiquitinada y la disocia de sus interactores para transferirla a las enzimas de desubiquitinación o al proteasoma. Este proceso reduce la concentración local de Aurora B en la cromatina y favorece la descondensación, así como la reformación de la envuelta nuclear. Por último, se ha demostrado que la ubiquitina-ligasa E3 Cullin-3 puede ubiquitinar a Aurora B, lo que sugiere que Cullin-3 y Cdc48/p97 pueden cooperar en el control de los niveles de Aurora B asociada a cromatina de manera dependiente de ubiquitina (Figura 19) (149, 156, 165-167). En *S. cerevisiae*, la chaperona Cdc48 tiene también un papel fundamental en el control del balance de la actividad de Ipl1, ya que regula positivamente junto a su cofactor Shp1 a la fosfatasa Glc7 (168).

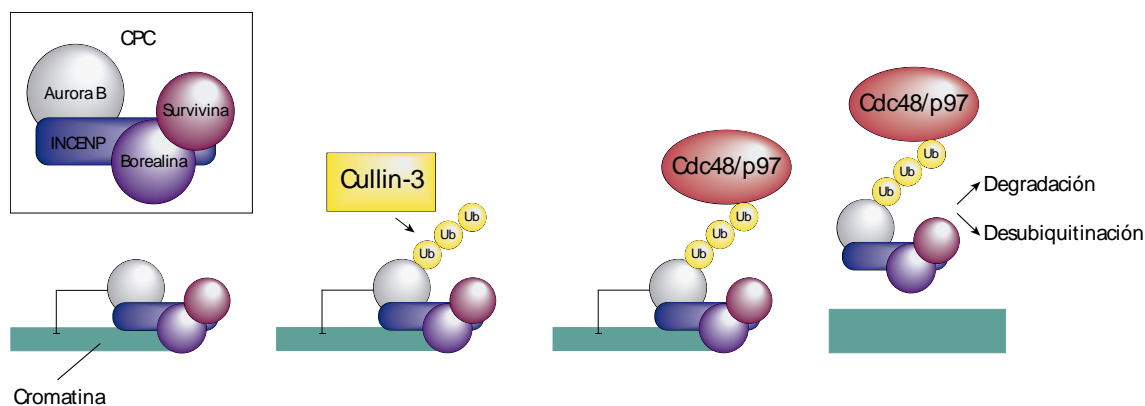


Figura 19. Modelo para la regulación de Aurora B y la descondensación de la cromatina durante la salida de mitosis. El CPC asociado a la cromatina mantiene la condensación cromosómica tras la inactivación de Cdk1 y previene la formación de la envuelta nuclear. En telofase, Aurora B es ubiquitinada por la ligasa de ubiquitina Cullin-3. El complejo AAA ATPasa Cdc48/p97, junto con su adaptador Ufd1-Npl4, se une a Aurora B ubiquitinada y la extrae de la cromatina gracias a la hidrólisis de ATP. En analogía con otros procesos mediados por Cdc48/p97, Aurora B podría ser degradada o desubiquitinada. Esta caída en la actividad de Aurora B en la cromatina permite la descondensación y la reformación de la envuelta nuclear.

1.3.2 Ensamblaje de la zona media del huso

En la transición metafase-anafase, Aurora B se libera desde los centrómeros y los brazos de los cromosomas y se transfiere a la zona media del huso y a la región ecuatorial del córtex celular. En general, este evento se consigue de al menos tres formas: la finalización del direccionamiento del CPC a los brazos de los cromosomas y al centrómero, la eliminación del CPC de estas localizaciones, y su relocalización y acumulación en el ecuador celular y el cuerpo medio (155). La relocalización del CPC coincide con una caída en la actividad Cdk1/Ciclina B1, ya que Cdk1 regula negativamente varias proteínas requeridas para la formación de la zona media del huso tales como PRC1, INCENP, MKLP2 y MKPL1 (Figura I10) (116).

La transferencia de INCENP a la zona media del huso requiere la interacción del CPC con la kinesina MKLP2, así como la propia actividad quinasa Aurora B. La eliminación de la fosforilación inhibitoria por parte de CDK1 en la treonina 59 de INCENP permite su interacción con MKLP2 y la consiguiente relocalización del CPC a la zona media del huso (103, 169). Además de la interacción de INCENP con MKLP2, el dominio de unión a microtúbulos de INCENP es requerido para su localización en el huso, lo que convierte al CPC en un componente estructural del huso central. Por otra parte, además de INCENP, Aurora B puede interaccionar directamente con MKLP2 y con Cul3-KLHL21, que también se localiza en la zona media del huso en anafase (115, 170). Adicionalmente, la reversión de la fosforilación inhibitoria de CDK1 sobre MKLP2 es también esencial para la relocalización del CPC. En células de mamífero, MKLP2 es necesario para el cambio de localización del CPC y viceversa, es decir, la localización de MKLP2 hasta los extremos (+) de los microtúbulos de la zona media depende a su vez de la interacción con el CPC (103, 171). En *S. cerevisiae*, que carece de MKLP2, la fosforilación de Ipl1 por Cdc28 (el homólogo de Cdk1) suprime la interacción con Bim1 (el homólogo de EB1). Esto inhibe la localización de Ipl1 a la zona media del huso hasta anafase (172). Además, la relocalización del CPC a la zona media del huso depende de la fosfatasa Cdc14, que se contrapone a la fosforilación inhibitoria de Cdc28 e Ipl1 en el dominio de unión a microtúbulos de Sli15 (155). Mientras que

en levaduras se sabe que Cdc14 es la fosfatasa encargada de desfosforilar a Sli15, en células de mamífero aún no está identificada la proteína encargada de la desfosforilación de la treonina 59 de INCENP (100).

Como en el caso del mecanismo de corrección de errores, un gradiente de fosforilación de Aurora B regula también el ensamblaje y la longitud de la zona media mediante dos mecanismos distintos. Por una parte, Aurora B fosforila a KIF2A y bloquea su actividad despolimerizadora de microtúbulos en la zona media, restringiendo la localización de KIF2A a los extremos (-) de los microtúbulos (173). Por otra parte, Aurora B también interviene en la formación del complejo entre la kinesina KIF4A y PRC1, importante para el ensamblaje del huso central (116, 117). PRC1 es una proteína MAP (asociada a microtúbulos) altamente conservada implicada en la regulación de la división celular en eucariotas superiores y levaduras, que se comporta como un factor estabilizador de microtúbulos (115). El transporte de PRC1 a la zona media del huso se consigue mediante la interacción con KIF4A (174-178). La formación del complejo PRC1/KIF4A se previene en metafase gracias a la fosforilación de CDK1 (177), pero tras el inicio de anafase, esta inhibición se contrarresta mediante la fosforilación de KIF4A por Aurora B, que a su vez estimula su actividad ATPasa dependiente de microtúbulos y suprime la dinámica de microtúbulos, limitando la longitud del huso central (179). De forma interesante, KIF4A es también responsable del mantenimiento de PP2A-B56 en el huso central, creando por lo tanto un bucle de retroalimentación negativo restringido espacialmente que se contrapone a Aurora B durante la citocinesis (180). En *S. cerevisiae*, Ase1, el homólogo de PRC1, muestra una actividad independiente de una proteína motora de la familia kinesina-4, ya que esta clase de proteínas no se encuentra en levaduras de gemación (181).

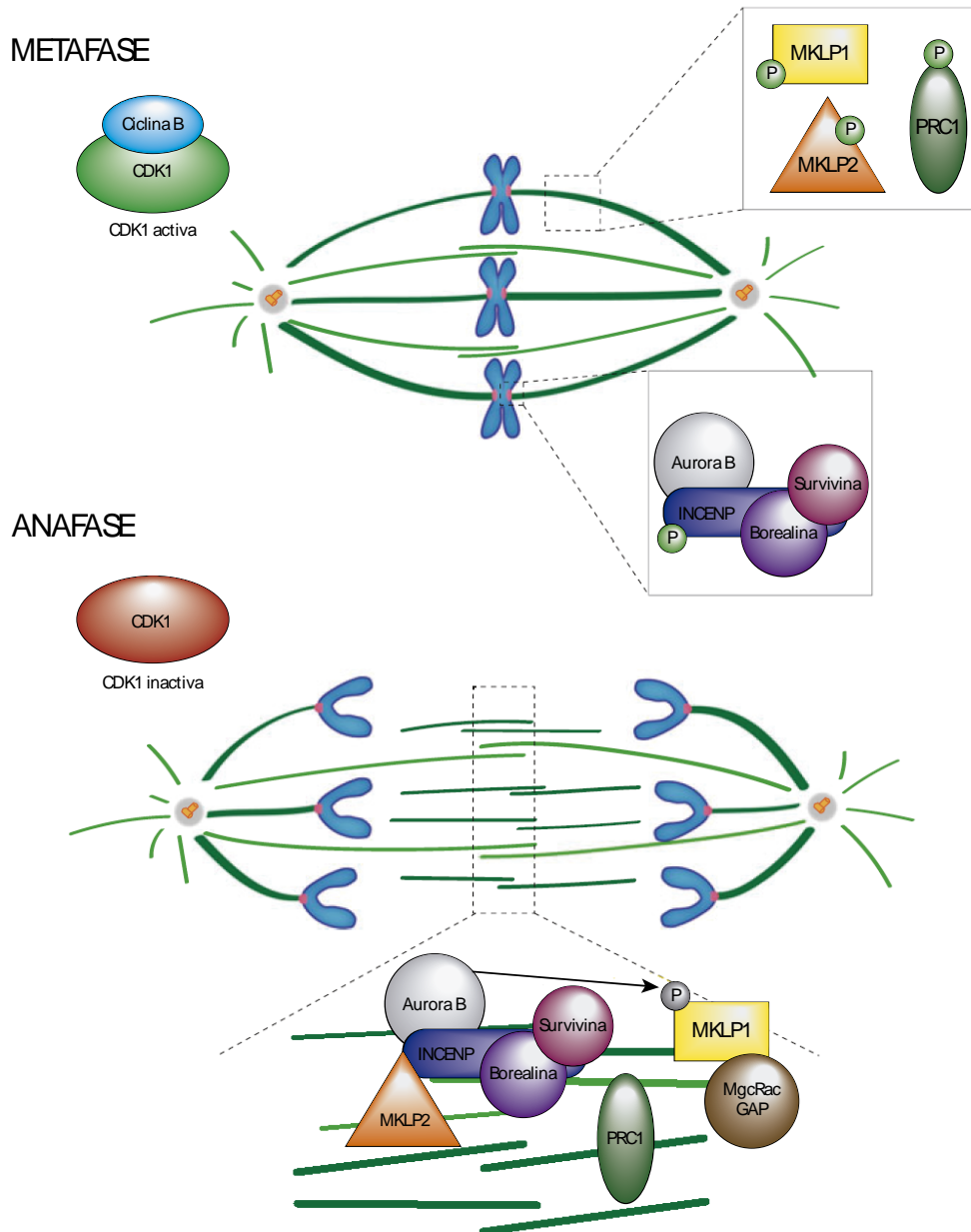


Figura 110. Establecimiento de la zona media del huso en la transición metafase-anafase. Durante metafase, la actividad CDK1 fosforila componentes de la zona media como MKLP1, PRC1, INCENP y MKLP2, impidiendo su asociación con microtúbulos. El silenciamiento del SAC permite la transición hasta anafase, lo que conduce a la degradación de la ciclina B y a la reducción de la actividad CDK1. Este paso permite la eliminación de las fosforilaciones inhibitorias, la unión de MKLP2 a INCENP y, en consecuencia, la relocalización del CPC a la zona media del huso. Concomitantemente, la desfosforilación de los sustratos de CDK1 PRC1 y MKLP1 activa su capacidad de unión de microtúbulos requerida para la estabilización de la zona media. Imagen adaptada de (116).

Además de PRC1 y KIF4A, MKLP1 y RacGAP1/MgcRacGAP/Cyk4 también tienen un papel fundamental en la integridad del huso central (182). MKLP1 es el componente motor del complejo centrolespindilina, un heterotetrámero compuesto por dos subunidades MKLP1 y dos moléculas RacGAP1/MgcRacGAP/Cyk4 (183). El complejo centrolespindilina se requiere para la formación y estabilización de la zona media del huso en muchos organismos, desde nematodos hasta humanos, estando también implicado en la citocinesis (184). La formación del complejo centrolespindilina se regula negativamente por la unión de la proteína 14-3-3 a MKLP1. Esta unión se contrarresta por la fosforilación dependiente de Aurora B de MKLP1 (185). De esta forma, mientras que el complejo MKLP1/14-3-3 se localiza en el citoplasma, MKLP1 se encuentra en el huso central tras ser fosforilada por Aurora B (Figura I10) (185).

1.3.3 Formación del cuerpo medio y ensamblaje del anillo contráctil

En anafase, el gradiente de fosforilación creado por Aurora B en la zona media del huso también señala el posicionamiento del anillo de ingresión (157). El CPC contribuye a la maduración del anillo contráctil y a su constricción a través de la regulación de RhoA (GTPasa que promueve la polimerización de actina y la activación de la miosina II (186)). El CPC recluta al complejo centrolespindilina a la zona media del huso y dicho complejo, a su vez, promueve la localización del factor de intercambio de nucleótidos RhoA GEF Ect2 hacia los microtúbulos (187-190). Adicionalmente, la fosforilación por Aurora B de MgcRacGAP, componente del complejo centrolespindilina, induce su actividad GAP hacia RhoA (191, 192). De esta forma, la organización de la centrolespindilina en la zona media del huso y el reclutamiento de la maquinaria reguladora de RhoA suponen un vínculo crítico entre el huso mitótico y la reorganización del citoesqueleto de actomiosina durante citocinesis (76, 192). Recientemente, se ha demostrado que el CPC interacciona directamente con la quinasa CIT-K, una proteína importante del cuerpo medio que une una red de proteínas del anillo contráctil con las proteínas del huso central

tanto en *Drosophila* como en humanos (117). El CPC y CIT-K dependen el uno del otro para su correcta localización en el cuerpo medio, y Aurora B fosforila a CIT-K para controlar su interacción con proteínas del huso central y su localización (193).

El anillo contráctil es una red compuesta por filamentos de actina nucleados por formina, miosina II, filamentos de septina y anilina (182). Se ha demostrado en diferentes organismos que el CPC está implicado en la regulación de las septinas (aunque el mecanismo en células humanas aún no ha sido descrito), de la cadena ligera de la miosina II y de los filamentos de actina durante la citocinesis (194-198). Además, contribuye a la ingresión del surco mediante la regulación del ensamblaje de filamentos intermedios, como es el caso de las láminas nucleares, GFAP, desmina y vimentina (76, 182, 194, 199, 200). Cuando se constriñe el anillo contráctil, la zona media del huso se estabiliza y forma el cuerpo medio (201). Recientemente, se ha demostrado que la estabilización de la zona media del huso es dependiente de la contracción del anillo de actomiosina, sugiriendo que existe una coordinación activa entre la ingresión del surco y la dinámica de microtúbulos (202). De manera interesante, para la estabilización de la zona media del huso y la consecuente citocinesis, se requiere la actividad quinasa de Aurora B y la interacción de INCENP con la actina (202).

1.3.4 Control de la abscisión

Antes de que la citocinesis tenga lugar, los cromosomas necesitan ser eliminados del plano de división para evitar que sean dañados durante la formación del anillo de ingresión (203). Así, la abscisión sólo ocurre después de que se complete la separación de las cromátidas hermanas. La importancia en el control de la abscisión reside en que defectos en la segregación de los cromosomas pueden conducir a fallos en la citocinesis y a la formación de células aneuploides o tetraploides, que desencadenan un proceso apoptótico o tumorigénico (204, 205). Por tanto, las células han desarrollado mecanismos para evitar la progresión de la

citocinesis en presencia de puentes cromosómicos (206). Entre estos destaca un punto de control que coordina la segregación de los cromosomas con la abscisión. En presencia de cromatina en el puente intercelular, dicho punto de control retrasa la abscisión hasta que la segregación completa de los cromosomas haya tenido lugar (206). En células somáticas, la incidencia estimada de puentes cromosómicos es de alrededor del 1% (207, 208), convirtiendo a este punto de control en un requerimiento esencial para el desarrollo del organismo. Además, a causa del potencial oncogénico de la tetraploidización (205, 209), este mecanismo de salvaguardia podría reducir el riesgo de cáncer en tejidos envejecidos, en los que la incidencia de puentes cromosómicos aumenta debido al acortamiento de los telómeros (210-212).

El punto de control que regula la abscisión fue descrito por primera vez en levaduras y se denomina NoCut (213). En *S. cerevisiae*, la ruta NoCut depende de la actividad quinasa de Ipl1, que se ha sugerido que responde a la presencia de cromatina acetilada en la zona media, siendo esencial en este punto de control Ahc1 (componente de andamiaje del complejo de acetilación de histonas ADA) (214, 215). Ipl1 media la translocación de las proteínas anilinas Boi1 y Boi2 a la zona de rotura, inhibiendo la función de las septinas y, de esta forma, impidiendo la abscisión (213, 215). En células humanas, existe un punto de control de la abscisión similar a la ruta NoCut de *S. cerevisiae*, que también es mediado por Aurora B (216). Aunque la señal concreta que activa Aurora B para retrasar la abscisión no está definida, se ha sugerido que la activación de Aurora B depende directamente del puente de cromatina (216). En contraposición a lo que ocurre en *S. cerevisiae*, la función principal del retraso de la abscisión en células humanas es prevenir la tetraploidización más que la rotura cromosómica (216). Esto sugiere que la maquinaria de abscisión es incapaz de cortar a través de la cromatina, lo cual podría deberse a la falta de un septo estabilizador o al grado de condensación más alto de los cromosomas humanos en comparación con los de levaduras (216).

En células de mamífero, el retraso de la abscisión requiere la fosforilación por parte de Aurora B de MKLP1 y CHMP4C (*Chromatin-Modifying Protein/Charged multivesicular body protein 4C*), una subunidad del complejo ESCRT-III (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport III*) que es esencial en la citocinesis, ya que se ha sugerido que los filamentos que forma proveen la fuerza de constricción durante la abscisión (206, 217). Por una parte, la fosforilación de MKLP1 estabiliza la interacción entre el anillo contráctil y el cuerpo medio, impidiendo la regresión del surco en células con puentes cromosómicos (216). Por otra parte, Borealina interacciona con CHMP4A, CHMP4B y CHMP4C, facilitando la fosforilación por Aurora B de CHMP4C (217, 218). CHMP4C y ANCHR retienen a VPS4 en el cuerpo medio. Una vez que Aurora B es desactivada, la desfosforilación de CHMP4C provoca la disociación del complejo ternario ANCHR-CHMP4C-VPS4, y esta liberación permite a VPS4 migrar a la zona de abscisión para mediar las fases finales de la citocinesis a través de sus efectos sobre el complejo ESCRT-III (Figura I11) (219).

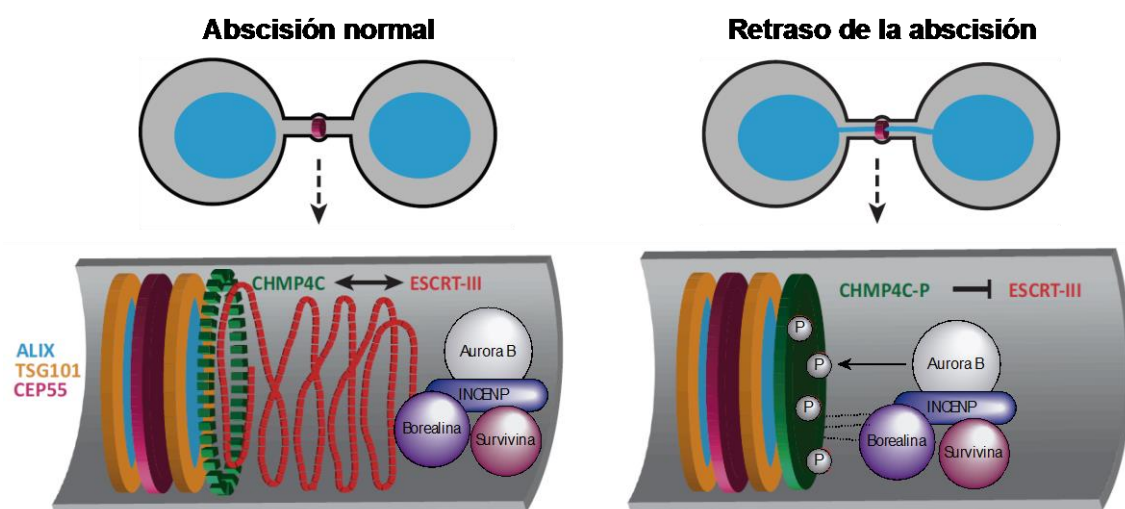


Figura I11. Regulación de la abscisión por el CPC. Cuando las cromátidas hermanas se han separado correctamente, se inactiva la función inhibitoria de CHMP4C y los filamentos de ESCRT-III pueden mediar la abscisión del cuerpo medio. Sin embargo, cuando existen puentes de cromatina en la zona de contracción, CHMP4C se une a Borealina y es fosforilado por Aurora B, que media su relocalización al cuerpo medio y retrasa la abscisión hasta que el puente de cromatina haya sido resuelto. CHMP4C es representado como un círculo verde discontinuo cuando no se localiza en el cuerpo medio y como un círculo sólido cuando es fosforilado y translocado al cuerpo medio. Imagen adaptada de (206).

1.4 Aurora quinasa y cáncer

1.4.1 Niveles de expresión de Aurora quinasa y cáncer

Una gran variedad de tumores presenta niveles de expresión elevados de las quinasas de la familia Aurora (117). El gen que codifica Aurora A fue originalmente denominado BTAK (*Breast Tumor Activated Kinase*), y se encuentra situado en la región 20q13.2, que aparece amplificada en varios tipos de cáncer humanos (220). El polimorfismo Phe31Ile se ha descrito como un alelo de susceptibilidad de baja penetrancia en tumores de mama, próstata, ovario, pulmón, esófago, colon y cáncer de piel no melanoma (221). El gen que codifica Aurora B se localiza en la región 17p13.1, cuya amplificación no se asocia frecuentemente con tumores, a excepción del glioblastoma (222). A pesar de la falta de amplificación a nivel génico, numerosos estudios han revelado un aumento de expresión de Aurora B tanto a nivel de ARNm como de proteína en diversos tipos de tumores, y este aumento se asocia con invasión del nódulo linfático, mayor proliferación y metástasis. En concreto, los niveles de Aurora B se han encontrado incrementados en carcinoma de pulmón microcítico, mesotelioma, glioblastoma, cáncer oral, carcinoma de endometrio maligno y hepatocelular, cáncer de tiroides, de colon y de próstata, así como en tumores de células germinales del testículo y de ovario (222-232).

El incremento en la expresión de Aurora B se asocia con una peor prognosis y un grado de malignidad más alto en diferentes lesiones neoplásicas, como en el caso del cáncer de próstata, colorrectal, ovario y tiroides (229, 230, 233, 234). Además, se ha sugerido que ciertos polimorfismos génicos de Aurora B están asociados con riesgo de cáncer de mama, como es el caso del polimorfismo funcional silente Ser295Ser (885A>G), que también se relaciona con un descenso en la supervivencia (232, 235). Además, una variante de *splicing* alternativo (Aurora B-Sv2) se ha encontrado con frecuencia asociada con estados avanzados de carcinoma hepatocelular y una mayor recurrencia y peor prognosis en tumores (226). Estos estudios sugieren que la expresión de Aurora B podría usarse para predecir lesiones agresivas así como marcador de prognosis (236).

La sobreexpresión de las quinasas de la familia Aurora y su asociación con inestabilidad genética y aneuploidía en tumores sugiere que un amplio rango de tipos de cáncer podría responder terapéuticamente a inhibidores de Aurora quinasas (80, 237).

1.4.2 Uso de inhibidores de Aurora como quimioterapéuticos

Durante años, se han apreciado las propiedades médicas de las llamadas drogas anti-microtúbulos, como el paclitaxel, que se unen directamente e inhiben a la tubulina (238). La efectividad de estas drogas reside en que las células cancerígenas necesitan una mayor dinámica de microtúbulos para mantener la alta tasa de división (239). Sin embargo, debido a que los microtúbulos también se requieren para otras numerosas funciones celulares, las drogas anti-microtúbulos son frecuentemente tóxicas para las células normales tanto en división como quiescentes. Entre los efectos secundarios asociados se incluyen las neuropatías periféricas, causadas por la inhibición de los procesos dependientes de microtúbulos en axones neuronales y células gliales (240). De manera notable, las concentraciones clínicamente relevantes de paclitaxel provocan la muerte en interfase sólo después de una mitosis perturbada, indicando que las aberraciones mitóticas son un prerrequisito para la actividad antitumoral de este tipo de drogas (241).

En la década pasada, y con el fin de disminuir los efectos secundarios, se desarrollaron inhibidores de la actividad de Aurora A y de Aurora B, los cuales inducen apoptosis mediante diferentes mecanismos. Algunas investigaciones sugieren que los inhibidores de Aurora A tienen más efectos citotóxicos que citoestáticos, mientras que otros estudios presentan a Aurora B como una diana más efectiva (242, 243). En la actualidad, existen alrededor de 30 inhibidores de Aurora quinasa en diferentes estados de desarrollo preclínico y clínico. Entre los inhibidores en estado clínico se encuentran barasertib o AZD1152 (profármaco

soluble en agua de AZD2811), alisertib, danusertib, AT283, PF-03814735 y AMG900 (244).

En células de cáncer proliferativas, el tratamiento con inhibidores de Aurora B induce fallos en citocinesis que producen células poliploides con múltiples centrosomas (245, 246). Después de la eliminación de las drogas, se espera que estas células entren en mitosis de forma altamente descoordinada, conduciendo a daños cromosómicos irreparables y la subsecuente muerte de las células tumorales. De hecho, los inhibidores de Aurora B son bastante efectivos en la eliminación de las células cancerígenas *in vitro* y en modelos xenográficos (247). Destacablemente, en tratamientos clínicos, el inhibidor de Aurora B AZD1152 mostró respuestas razonables como único agente para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda en aproximadamente el 25% de los pacientes, sin dar lugar al desarrollo de una neuropatía significativa, garantizando así su evaluación en otras enfermedades hematológicas (248).

Los inhibidores de Aurora quinasa se desarrollaron inicialmente para atacar tumores sólidos, incluyendo los de ovario, mama, pulmón y colon(220). Sin embargo, en este tipo de tumores AZD1152 no da lugar a una respuesta significativa (249). La explicación más plausible para este resultado es que la tasa de división de las células de estos tumores sea relativamente más lenta que en los modelos preclínicos, hecho que puede hacerlos menos susceptibles a la acción de AZD1152. Así, cuando el efecto del inhibidor de Aurora quinasa se mantenía a través de varios ciclos celulares en tumores, las células más proliferativas de la médula ósea se veían afectadas de forma severa (155, 220). Por lo tanto, es necesaria una mayor investigación clínica para saber qué tipo o tipos de tumores serán los más apropiados para responder a los inhibidores de Aurora B y qué factores genéticos o del medio contribuyen a las respuestas biológicas de las células tumorales. Por otro lado, estudios recientes han demostrado que la inhibición simultánea de un oncogén activo y de las quinasas Aurora usando compuestos con farmacología dual o inhibidores de Aurora en combinación con inhibidores de oncogenes puede ser una estrategia para conseguir una mejora

significativa en los resultados clínicos y también impedir la resistencia (220). En concreto, AZD1152 está siendo actualmente evaluado en un ensayo en fase III en combinación con otras drogas quimioterapéuticas (250). Finalmente, es importante señalar que se está aplicando la nanotecnología para la encapsulación de AZD2811 con resultados prometedores. Al aumentar la concentración de droga en los sitios tumorales en relación con el tejido sano, las formulaciones de nanopartículas tienen el potencial de mejorar tanto la eficacia como la seguridad, permitiendo tratamientos que, de otra forma, tienen limitaciones por el estrecho índice terapéutico (251, 252).

2 Objetivos

1. Reevaluación de la relación funcional entre Aurora quinasa B y el punto de control de ensamblaje del huso.
2. Obtención de un modelo experimental en *Saccharomyces cerevisiae* para el estudio de los efectos del incremento de la actividad Aurora quinasa B.
3. Análisis de los efectos del incremento de la actividad Aurora quinasa B sobre el ciclo celular y la segregación cromosómica en *Saccharomyces cerevisiae*.
4. Análisis de los efectos de la sobreexpresión de Aurora B e INCENP sobre el ciclo celular y la segregación cromosómica en líneas celulares humanas.

3 Resultados

3.1 Reevaluación de la relación funcional entre Aurora B y el punto de control de ensamblaje del huso

Para que el material genético sea repartido de forma fiel durante la división mitótica se requiere la unión de todos los cromosomas al huso mitótico, siendo esencial durante este proceso el punto de control de ensamblaje del huso (SAC) (19). Sin embargo, la unión de todos los cromosomas al huso no es suficiente para garantizar una correcta segregación de los cromosomas; también es necesario que cada una de las cromátidas hermanas del mismo cromosoma se una a un polo distinto de este haz bipolar de microtúbulos, estado que se conoce como bi-orientación de los cromosomas (253). La quinasa Aurora B es esencial en este proceso, y colabora con el SAC en la reparación de las uniones microtúbulo-cinetocoro incorrectas (76). Se ha propuesto un modelo lineal para explicar la resolución de las uniones cromosómicas sintéticas (aquellas en las que ambas cromátidas están unidas al mismo polo del huso) mediante la actividad conjunta de Aurora B y el SAC. En base a este modelo, Aurora B es capaz de detectar las conexiones incorrectas que no originan tensión en el huso y las desestabiliza, generando cinetocoros no unidos a microtúbulos que conducen a la activación del SAC. Dicho punto de control bloquea entonces el ciclo celular en metafase, proporcionando a las células el tiempo necesario para restablecer las uniones microtúbulo-cinetocoro antes de progresen hasta anafase (19, 254). En base a este modelo lineal, sería esperable que tanto una deficiencia en Aurora B como la falta del SAC condujeran a problemas similares de segregación cromosómica. No obstante, los fenotipos de los mutantes en Aurora B y el SAC son muy diferentes. Esto es especialmente evidente en el caso de *S. cerevisiae*. En este organismo, *IPL1*, el homólogo de Aurora B, es un gen esencial y su inactivación conduce a fallos graves de segregación cromosómica (70). Por el contrario, los mutantes en el SAC

son totalmente viables en condiciones normales de crecimiento, y no muestran problemas evidentes de aneuploidía (255).

Para explicar la diferencia de fenotipos asociados a la falta del SAC y a la reducción de la actividad quinasa de Ipl1 en *S. cerevisiae*, pueden considerarse varias hipótesis. Así, por una parte, se ha sugerido que Ipl1 podría ser capaz de detener la progresión del ciclo celular con independencia del SAC (256), lo que dotaría a las células con el tiempo que la quinasa necesita para corregir las uniones microtúbulo-cinetocoro incorrectas en ausencia de dicho punto de control. Por otra parte, también podría ocurrir que Ipl1 repare eficientemente todas las uniones sintéticas de los cromosomas durante las fases iniciales del ensamblaje del huso, de forma que el SAC se satisficiera, o incluso que no llegase a activarse, antes de que las células estuvieran preparadas para entrar en la transición metafase-anafase. Esto explicaría la dispensabilidad de este mecanismo de vigilancia en condiciones normales de crecimiento.

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, hemos reevaluado la relación funcional entre Ipl1 y el SAC, con el fin de explicar la aparente discrepancia entre los fenotipos asociados, en cada caso, a su deficiencia.

3.1.1 La reducción de la actividad quinasa de Ipl1 determina defectos sinérgicos de segregación cromosómica y viabilidad celular en mutantes deficientes en el SAC

Como se ha comentado anteriormente, una de las posibles hipótesis planteadas para explicar la discrepancia entre los fenotipos observados en *S. cerevisiae* para mutantes deficientes en Ipl1 y células con un SAC inactivo es que dicha quinasa podría ser capaz de detener el ciclo celular de forma independiente del SAC. Así, Ipl1 podría actuar inhibiendo directamente la acción de APC/C^{Cdc20}. Sin embargo, y a pesar de algunas evidencias previas (162, 257), en nuestro laboratorio, hemos

sido incapaces de encontrar ninguna interacción física entre estas proteínas en *S. cerevisiae* que apoye esta posibilidad. De este modo, decidimos evaluar una hipótesis alternativa. En concreto, la diferencia de fenotipos asociados a la falta de actividad Ipl1 o del SAC en *S. cerevisiae* también podría deberse a que, en condiciones normales de crecimiento, Ipl1 sea capaz de corregir eficientemente las uniones microtúbulo-cinetocoro incorrectas durante las etapas iniciales del ensamblaje del huso, sin necesidad de la activación del SAC. En este caso, la viabilidad de las células con actividad Ipl1 reducida y, por tanto, con una menor eficiencia de corrección de uniones microtúbulo-cinetocoro, debería ser más dependiente de la funcionalidad del SAC. Con el fin de comprobar esta hipótesis, hicimos uso del alelo termosensible *ipl1-321*, que codifica una proteína mutante de Ipl1 que muestra una reducción de 12 veces en su actividad quinasa a la temperatura restrictiva (258). Las células portaban adicionalmente una versión marcada con GFP del cromosoma IV (CrIV-GFP), la cual permite analizar la segregación cromosómica. El marcaje con GFP del cromosoma se consigue mediante la integración de una sucesión de secuencias del operador de la tetraciclina (*tetO*) cercanas al centrómero del cromosoma IV y la expresión constitutiva simultánea de una fusión tetR-GFP. El represor tetR reconoce y se une a las secuencias *tetO*, permitiendo visualizar en el microscopio de fluorescencia el cromosoma IV de forma indirecta como un punto fluorescente (Figura R1B) (259, 260).

Resultados

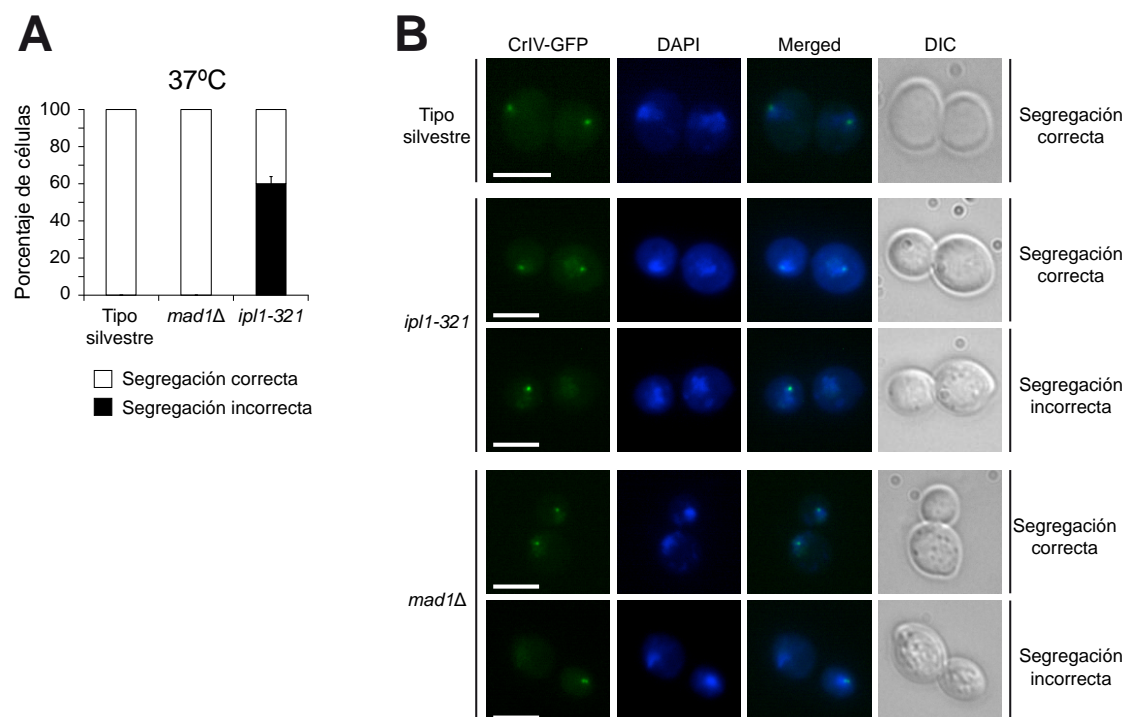


Figura R1. Diferencia de fenotipos asociados a la falta del SAC y a la actividad reducida de *Ipl1*. Células del tipo silvestre (F955) y células de los mutantes *mad1Δ* (F142) e *ipl1-321* (F323) con el CrIV-GFP se crecieron a 26°C en YPAD y se sincronizaron en G1 haciendo uso de la feromona factor alfa (5 µg/ml). Una vez sincronizadas, las células se liberaron a 37°C en YPAD. **(A)** Análisis de la segregación cromosómica. Las barras de error indican la desviación estándar (n = 3). **(B)** Imágenes representativas de segregación cromosómica correcta e incorrecta. Para cada célula se muestra el CrIV (CrIV-GFP; verde), el ADN (DAPI; azul), una imagen combinada del DAPI y el CrIV-GFP (Merged) y una imagen de microscopía diferencial de contraste de interferencia (DIC). Barra de escala = 5 µm.

De acuerdo con publicaciones previas, las células *ipl1-321*, a pesar de poseer un SAC completamente funcional (son capaces de bloquear el ciclo en metafase en presencia de drogas despolimerizadoras de microtúbulos (71, 256)), mostraban problemas graves de segregación cromosómica durante anafase a la temperatura restrictiva (Figura R1). Estos problemas determinaban letalidad celular a esta temperatura (Figura R2A). A diferencia del mutante *ipl1-321*, las células que poseen una delección del gen *MAD1* (un componente fundamental del SAC (31)) no mostraban problemas de segregación cromosómica evidentes (Figura R1A) y son

perfectamente viables (Figura R2A), al igual que se ha demostrado previamente para células que carecen de *MAD2* (otro componente esencial del SAC) (255).

De forma interesante, y de acuerdo a nuestra hipótesis inicial, la viabilidad de las células *ipl1-321* se veía reducida en ausencia del SAC tanto a temperatura permisiva como a semi-permisivas (Figura R2A). Los defectos de viabilidad del mutante *ipl1-321 mad1Δ* se debían a fallos en la segregación cromosómica (Figura R2B). De acuerdo con estos resultados, las células *ipl1-321 mad1Δ* también mostraban mayor inestabilidad genómica que las células *ipl1-321* y las células *mad1Δ* en ensayos de pérdida de plásmido (Figura R2C). Estos ensayos permiten detectar defectos de inestabilidad genómica más sutiles mediante el cálculo de la proporción de células que no son capaces de mantener un plásmido centromérico en medio no selectivo. Finalmente, y conforme a los datos anteriores, la viabilidad celular se reducía en células *mad1Δ* en las que la actividad de Ipl1 se disminuía haciendo uso del alelo *ipl1-as5* (254), sensible al análogo del ATP 3MB-PP1 (Figura R2D). En resumen, por tanto, nuestros resultados demuestran que la reducción de actividad de Ipl1 junto con la ausencia del SAC conduce a defectos sinérgicos de segregación cromosómica que comprometen la viabilidad celular.

Resultados

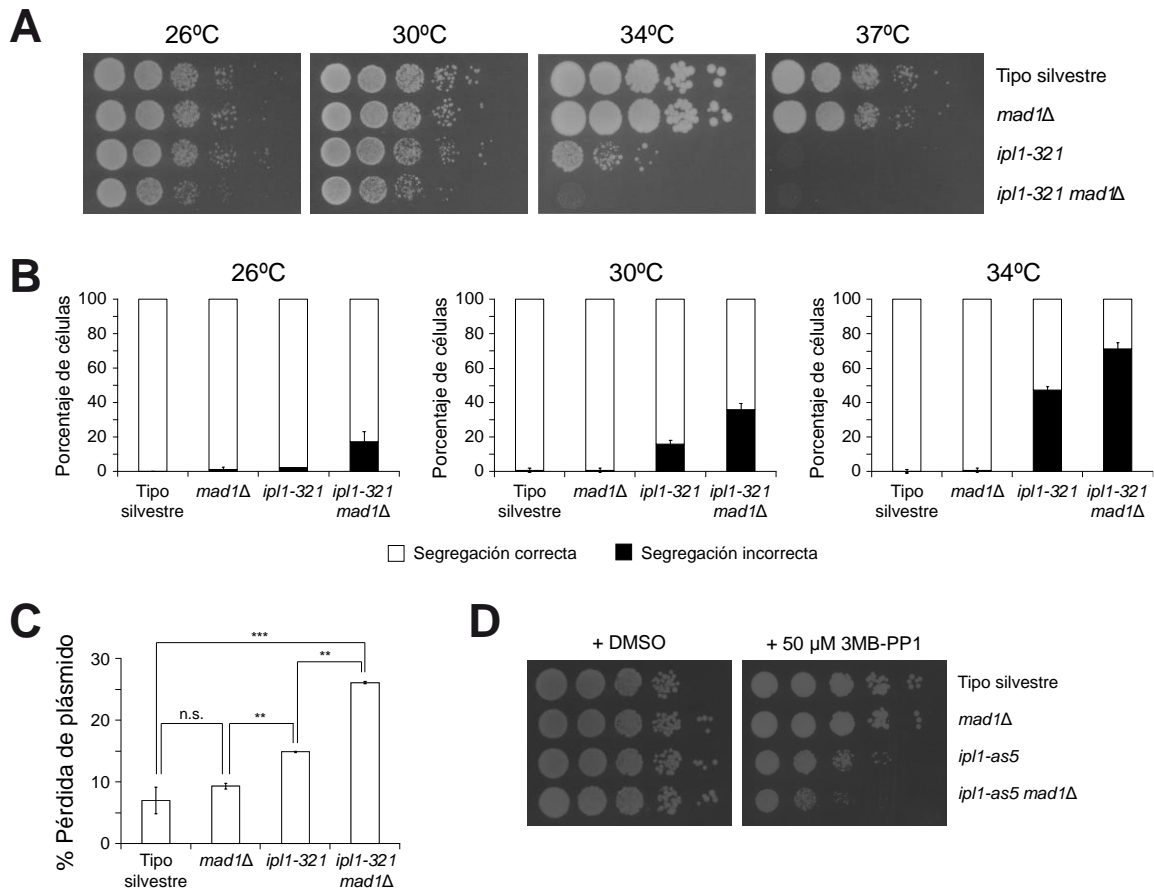


Figura R2. Defectos sinérgicos de crecimiento e inestabilidad genómica asociados a la falta del SAC y la actividad reducida de Ipl1. (A) Células del tipo silvestre (F496) y células de los mutantes *mad1Δ* (F350), *ipl1-321* (F267) e *ipl1-321 mad1Δ* (F2414) se crecieron a 26°C en YPAD. La viabilidad celular se determinó mediante un test de diluciones seriadas en el que las células se sembraron en placas de YPAD y se incubaron a la temperatura indicada en cada caso. (B) Células del tipo silvestre (F955) y células de los mutantes *mad1Δ* (F142), *ipl1-321* (F323) e *ipl1-321 mad1Δ* (F2493) con el CrIV-GFP se crecieron a 26°C en YPAD y se sincronizaron en G1 haciendo uso de la feromona factor alfa (5 μ g/ml). Una vez sincronizadas, las células se liberaron del bloqueo en G1 en YPAD a la temperatura indicada en cada caso. Se muestra el análisis de la segregación del CrIV-GFP a cada una de las temperaturas. Las barras de error indican la desviación estándar (n = 3). (C) Ensayo de pérdida de plásmido con células del tipo silvestre (F496) y células de los mutantes *mad1Δ* (F350), *ipl1-321* (F267) e *ipl1-321 mad1Δ* (F2414) transformadas con el plásmido pRS316. La gráfica muestra los valores medios y las desviaciones estándar de tres test de fluctuación para cada estirpe, cada uno realizado a partir de 6 colonias independientes. Se detallan las diferencias que son estadísticamente significativas (***, P < 0.001; y **, P < 0.01) o no-significativas (n.s.) de acuerdo a un test de dos colas. (D) Células del tipo silvestre (F496) y células de los mutantes *mad1Δ* (F350), *ipl1-as5* (F1696) e *ipl1-as5 mad1Δ* (F1956) se crecieron a 26°C en YPAD. La viabilidad celular se determinó mediante un test de diluciones seriadas en el que las células se sembraron en placas de YPAD con 50 μ M de inhibidor 3MB-PP1 o sin inhibidor, incubadas a 26°C. A las placas control se les añadió DMSO por ser el solvente donde está preparado el inhibidor 3MB-PP1.

3.1.2 El retraso de la activación de Ipl1 en el ciclo celular hace al SAC esencial para la segregación correcta de los cromosomas

Si bien los resultados anteriores están de acuerdo con la hipótesis de que Ipl1 podría corregir eficientemente las uniones microtúbulo-cinetocoro incorrectas durante las fases iniciales del ciclo celular sin necesidad de que el SAC le proporcione tiempo adicional, también podrían explicarse en base a que Ipl1 posea capacidad propia de detener el ciclo celular. Para discernir entre estas dos posibilidades, retrasamos el inicio de la actividad de Ipl1, reduciendo el tiempo del que la quinasa dispone para garantizar la bi-orientación de los cromosomas, y comprobamos la necesidad de un SAC funcional para garantizar una segregación cromosómica correcta en estas condiciones. Esta aproximación requiere un alelo condicional de *IPL1* que nos permita controlar de forma precisa la expresión de esta quinasa. Debido a que las células *ipl1-321 mad1Δ* mostraban defectos de segregación cromosómica ya evidentes a la temperatura permisiva, decidimos utilizar una estrategia distinta. En concreto, generamos una estirpe en la que la expresión de la única copia de *IPL1* está controlada por el promotor del gen *MET3* (*pMET3*), reprimible por metionina. Adicionalmente, en estas células el gen *IPL1* se encuentra fusionado transcripcionalmente a un degrón inducible por temperatura, que permite la degradación rápida de la proteína a 37°C (*Ub-DHFR*, (261)). Las células *pMET3-Ub-DHFR-IPL1* no expresaban Ipl1 en medio con metionina a 37°C (Figura R3A), lo cual provocaba problemas graves de segregación cromosómica, similares a los observados en el caso del alelo *ipl1-321* (Figura R3B). Estos problemas conducían, en última instancia, a letalidad celular (Figura R3C). Sin embargo, las células se comportaban como las del tipo silvestre en medio sin metionina a temperatura permisiva e, incluso, a la restrictiva (Figura R3B y R3C).

Resultados

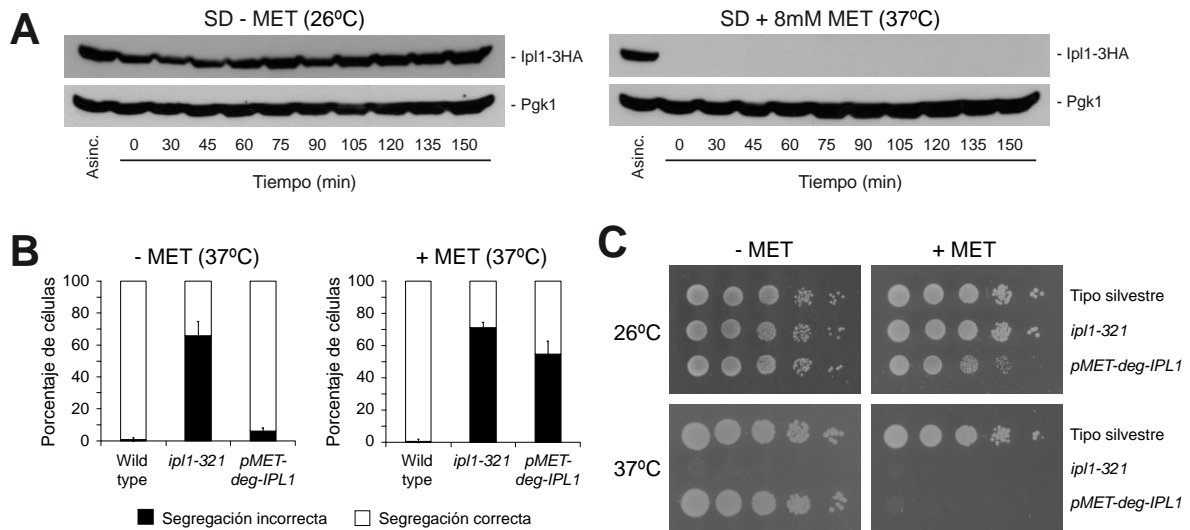


Figura R3. Generación de un nuevo alelo condicional de *IPL1*. (A) Células *pMET3-Ub-DHFR-IPL1-3HA* (*pMET-deg-IPL1*; F1595) se crecieron en SD sin metionina (SD-MET) a 26°C y se sincronizaron en G1 haciendo uso de la feromona factor alfa (5 µg/ml). Una vez sincronizadas, las células se liberaron en SD-MET a 26°C o en SD con 8 mM de metionina a 37°C. Se muestra el análisis Western de los niveles de Ipl1-3HA en un cultivo asincrónico (en SD-MET a 26°C) y a los tiempos indicados tras la liberación del bloqueo en G1. Los niveles de Pgk1 (3-fosfoglicerato quinasa) se usaron como control de carga. (B) Células del tipo silvestre (F955) y células de los mutantes *ip11-321* (F323) y *pMET3-Ub-DHFR-IPL1* (*pMET-deg-IPL1*; F1517) con el CrIV-GFP se crecieron en SD-MET a 26°C y se sincronizaron en G1 haciendo uso de la feromona factor alfa (5 µg/ml). Una vez sincronizadas, las células se liberaron en SD-MET (-MET) o con 8 mM de metionina (+MET) a 37°C. Se muestran los porcentajes de segregación correcta e incorrecta del CrIV-GFP. Las barras de error indican la desviación estándar (n = 3). (C) Análisis de la viabilidad celular mediante test de diluciones seriadas de células de la estirpe silvestre (F496) y células de los mutantes *ip11-321* (F323) y *pMET3-Ub-DHFR-IPL1* (F1124). Las células se cultivaron en SD-MET a 26°C y se sembraron en placas de SD-MET (-MET) y SD con 8 mM de metionina (+MET), incubadas a 26°C ó 37°C.

Con el fin de probar la capacidad del alelo *pMET3-Ub-DHFR-IPL1* de corregir las uniones microtúbulo-cinetocoro erróneas en ausencia de un SAC funcional, llevamos a cabo un experimento control inicial en el que células *pMET3-Ub-DHFR-IPL1-3HA CDC20-AID* y células *pMET3-Ub-DHFR-IPL1-3HA CDC20-AID mad1Δ* se bloquearon en metafase haciendo uso del alelo *CDC20-AID* (Figura R4 y R5A). *CDC20-AID* codifica un degrón de Cdc20 inducible por auxina (IAA), que permite bloquear el ciclo en metafase debido a la inactivación del cofactor del APC/C tras la adición de auxina al medio. Las células *pMET3-Ub-DHFR-IPL1-3HA CDC20-AID* en

las que se permitía la expresión continua de Ipl1 progresaban de manera similar por el ciclo celular en presencia y en ausencia del SAC, y en ambos casos las células bi-orientaban correctamente las cromátidas hermanas (Figura R5B, R5C y R5D). La ligera caída en los niveles de Ipl1 que se observa tras la reactivación de Cdc20 podría reflejar una degradación de esta quinasa dependiente del APC/C en la transición metafase-anafase. En cualquier caso, y como demuestran los resultados anteriores, esta caída no afecta a la progresión del ciclo celular ni a la segregación de los cromosomas. Durante el bloqueo dependiente de Cdc20, las células *pMET3-Ub-DHFR-IPL1-3HA CDC20-AID* y las células *pMET3-Ub-DHFR-IPL1-3HA CDC20-AID mad1Δ* mostraban un huso corto, de aproximadamente 2 μm de longitud, con una morfología típica de metafase, y que se mantenía hasta que Cdc20 era reactivado y las células entraban en anafase (Figura R5E, R5F y R5G). Esta morfología indica la existencia de tensión en el huso como consecuencia de la correcta bi-orientación de los cromosomas y, por tanto, una actividad eficiente de Ipl1. En resumen, todos estos datos demuestran que el alelo *pMET3-Ub-DHFR-IPL1* es completamente funcional.

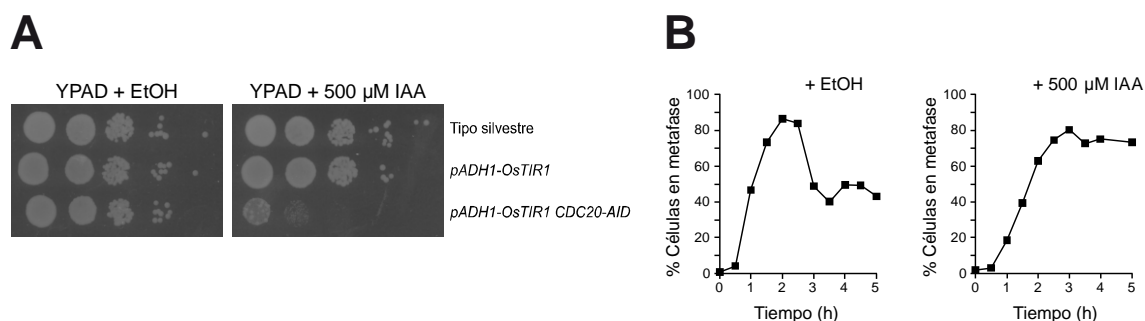


Figura R4. Caracterización del alelo *CDC20-AID*. **(A)** Células del tipo silvestre (F496) y células *pADH1-OsTir1* (F1664) y *pADH1-OsTir1 CDC20-AID* (F1704) se crecieron en YPAD a 26°C. La viabilidad celular se determinó mediante un test de diluciones seriadas en placas de YPAD con IAA (+500 μM IAA) o sin IAA (+EtOH) incubadas a 26°C. La placa control contiene etanol absoluto por ser el solvente donde se preparó la auxina. **(B)** Células *pADH1-OsTir1 CDC20-AID* (F1704) se crecieron en YPAD a 26°C y se sincronizaron en G1 haciendo uso de la feromona factor alfa (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Posteriormente, se liberaron en YPAD con IAA (+500 μM IAA) o sin IAA (+EtOH) a 37°C. Se muestra el análisis de células en metafase en base a la morfología del huso y del núcleo en los tiempos indicados tras la liberación del bloqueo en G1. El cultivo control contiene etanol absoluto por ser el solvente donde se preparó la auxina.

Resultados

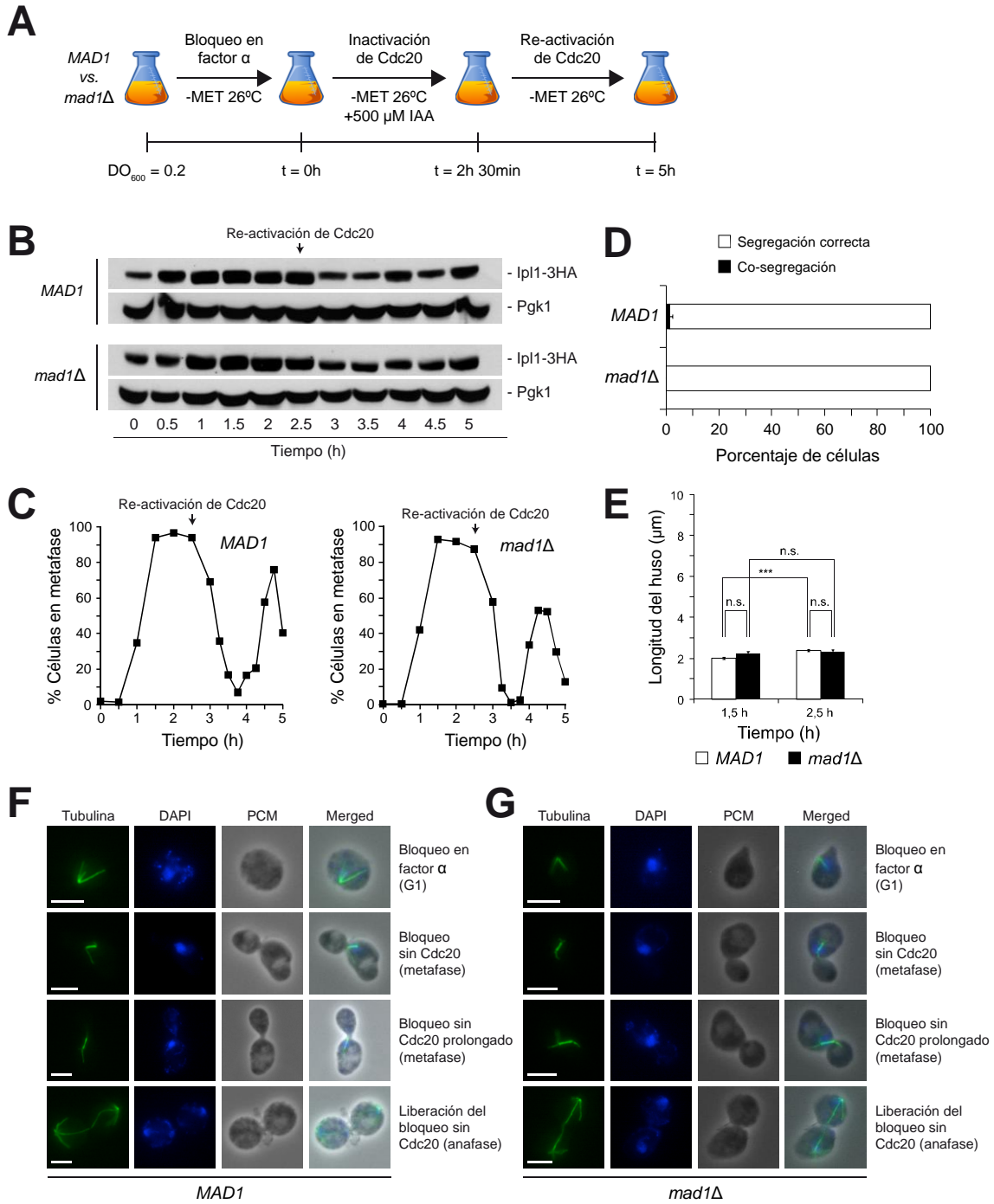


Figura R5. Funcionalidad del alelo *pMET3-Ub-DHFR-IPL1*. (A-F) Células *pMET3-Ub-DHFR-IPL1-3HA CDC20-AID* (*MAD1*; F1940) y células *pMET3-Ub-DHFR-IPL1-3HA CDC20-AID mad1Δ* (*mad1Δ*; F1942) con el CrIV-GFP se crecieron en SD-MET a 26°C y se sincronizaron en G1 haciendo uso de la feromona factor alfa (5 μg/ml). Posteriormente, se liberaron en SD-MET con 500 μM IAA. Tras 2,5 horas en medio con IAA, las células se lavaron y se resuspendieron en SD-MET y sin IAA a 26°C. (A) Diseño experimental. (B) Análisis Western de los niveles de Ipl1-3HA en los tiempos indicados tras la liberación de G1. Los niveles de Pgk1 se usaron como control de carga. (C) Análisis del porcentaje de células en metafase en base a la morfología del huso y el núcleo en los tiempos

indicados tras la liberación del bloqueo en factor alfa. **(D)** Análisis de la segregación del CrIV-GFP. Las barras de error indican la desviación estándar ($n = 3$). **(E)** Longitud media del huso en los tiempos indicados. Las barras de error indican la desviación estándar de la media (SEM; $n = 75$). Se muestran las diferencias estadísticamente significativas (***, $P < 0.001$) o no significativas (n.s.) de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Student-Newman-Keuls. **(F-G)** Imágenes representativas de células *pMET3-Ub-DHFR-IPL1-3HA CDC20-AID* (**F**; F1940) y *pMET3-Ub-DHFR-IPL1-3HA CDC20-AID mad1Δ* (**G**; F1942). Para cada célula se muestra el huso (Tubulina; verde), el núcleo (DAPI; azul), una imagen de microscopía de contraste de fases (PCM) y una imagen combinada del huso, el núcleo y PCM (Merged). Barra de escala = 5 μm .

Tras comprobar la funcionalidad del alelo condicional *pMET3-Ub-DHFR-IPL1-3HA*, usamos este alelo para retrasar el inicio de la actividad de Ipl1 durante la progresión del ciclo celular y analizar, en estas condiciones, si la capacidad de las células de corregir las uniones sintéticas de los cromosomas es dependiente del SAC. En concreto, las células se bloquearon en metafase en ausencia de Cdc20 y de Ipl1. Una hora antes de la reactivación de Cdc20, se indujo la transcripción de Ipl1, aunque se siguió manteniendo la temperatura restrictiva. Pasado este tiempo, se permitió la progresión por el ciclo en condiciones permisivas tanto para la expresión de Cdc20 como de Ipl1 (Figura R6A y R6B). Durante el bloqueo en metafase provocado por la ausencia de Cdc20, el huso se elongaba de forma anormal (Figura R6E, R6F y R6G). Este hecho es indicativo de que la falta de actividad Ipl1 durante los estadios tempranos del ensamblaje del huso provocaba una acumulación de cromosomas mono-orientados y, como consecuencia, una reducción de la tensión en el huso. Las células *pMET3-Ub-DHFR-IPL1-3HA CDC20-AID* prolongaban el bloqueo en metafase temporalmente después de que se indujera la expresión de Cdc20, pero finalmente entraban en anafase y salían del ciclo (Figura R6C). Remarcablemente, y a diferencia de lo que ocurría en las células con un SAC funcional, las células *pMET3-Ub-DHFR-IPL1-3HA CDC20-AID mad1Δ* no eran capaces de mantener temporalmente el bloqueo tras la inducción de la expresión de Cdc20 y progresaban inmediatamente hasta anafase (Figura R6C). De esta forma, mientras que la inducción de la expresión de Ipl1 en las células *pMET3-Ub-DHFR-IPL1-3HA CDC20-AID* permitía la reparación de todas las uniones microtúbulo-cinetocoro incorrectas y el restablecimiento de la bi-orientación

Resultados

cromosómica (Figura R6D), como se evidenciaba por la recuperación de la morfología normal del huso (Figura R6E y R6F), las células carentes de un SAC funcional nunca recuperaban la morfología de huso corto metafásico y progresaban hasta anafase sin reparar las uniones sintéticas (Figura R6D, R6E y R6G).

Los resultados anteriores demuestran que el SAC se convierte en esencial cuando se retrasa el inicio de la actividad Ipl1. En estas condiciones, la quinasa no es capaz de detener la progresión del ciclo celular con independencia de este mecanismo de vigilancia para garantizar la bi-orientación de los cromosomas. En concordancia con esta línea argumental, no se observaban problemas en la segregación de los cromosomas en las células *pMET3-Ub-DHFR-IPL1-3HA CDC20-AID mad1Δ* cuando la actividad de Ipl1 se retrasaba sólo hasta fase S (Figura R7) y, por tanto, la quinasa tenía el tiempo necesario tras la inducción de su expresión para resolver las uniones microtúbulo-cinetocoro incorrectas.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, nuestros datos están de acuerdo con un modelo de regulación de la segregación cromosómica en el que la quinasa Ipl1 es capaz de reparar las uniones sintéticas eficientemente en las etapas iniciales del ciclo celular. Esto determina que el establecimiento del huso mitótico bipolar tenga lugar antes de que las células estén preparadas para iniciar la transición metafase-anafase y las uniones sintéticas puedan llegar a suponer un problema para las células. De este modo, el SAC actúa como un mecanismo de seguridad que sólo se convierte en esencial en situaciones en las que se ve afectada la captura de los cinetocoros por los microtúbulos, permitiendo detener el ciclo y garantizar la viabilidad celular en estas condiciones.

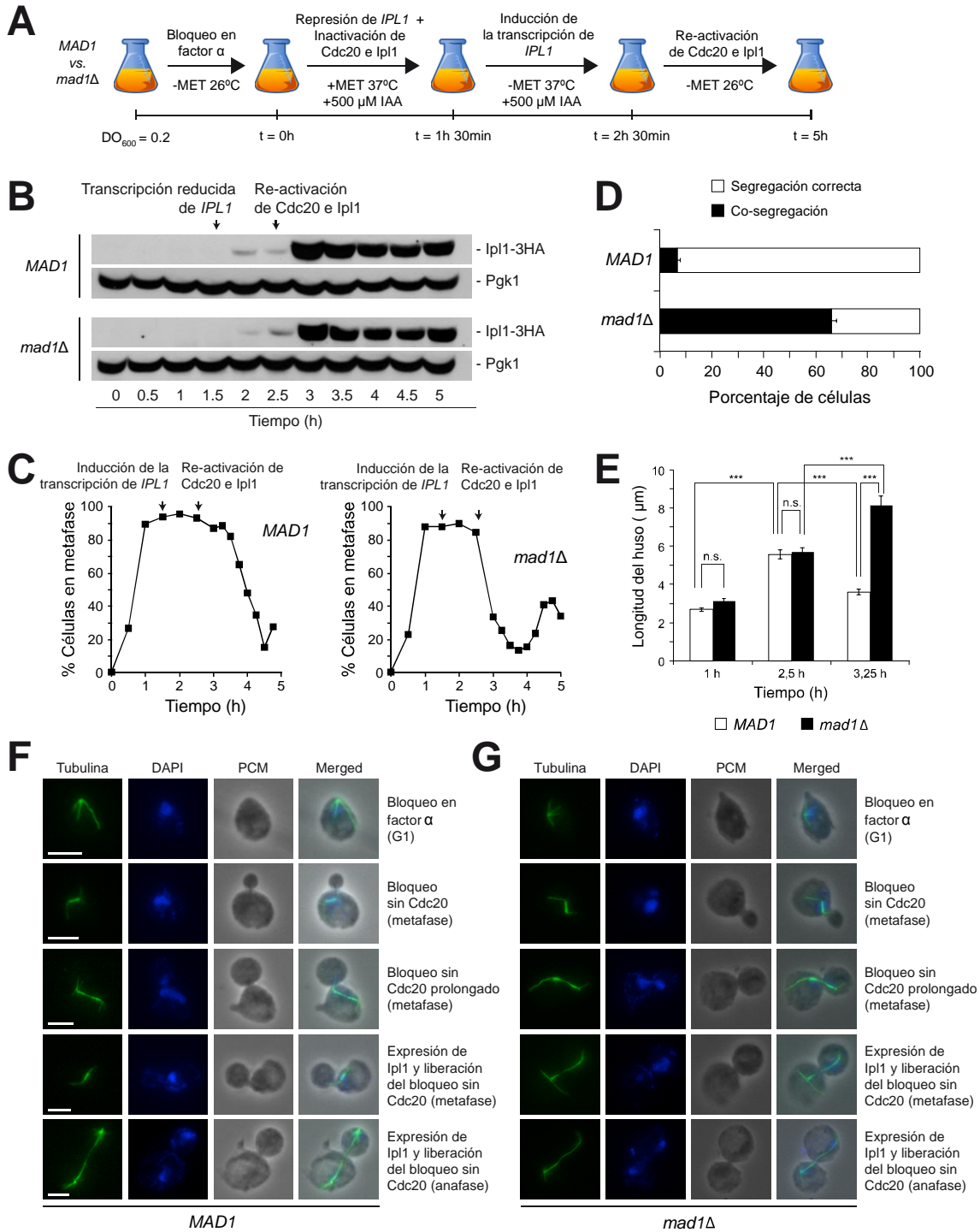


Figura R6. Retraso del inicio de actividad de Ipl1 durante la progresión del ciclo celular. Células *pMET3-Ub-DHFR-IPL1-3HA CDC20-AID* (*MAD1*; F1940) y células *pMET3-Ub-DHFR-IPL1-3HA CDC20-AID mad1Δ* (*mad1Δ*; F1942) con el CrIV-GFP se cultivaron en SD-MET a 26°C y se sincronizaron en G1 haciendo uso de la feromona factor alfa (5 μg/ml). Posteriormente, se liberaron en SD con metionina 8 mM e IAA 500 μM a 37°C. Después de 1,5 h, las células se transfirieron a SD-MET con IAA 500 μM a 37°C. Finalmente, 1 h más tarde, las células se lavaron y se resuspendieron en SD-MET a 26°C. **(A)** Diseño experimental. **(B)** Análisis Western de los niveles de Ipl1-3HA en los

Resultados

tiempos indicados tras la liberación del bloqueo en G1. Los niveles de Pgl1 se usaron como control de carga. **(C)** Análisis del porcentaje de células en metafase en base a la morfología del huso y el núcleo para cada tiempo tras la liberación del bloqueo en G1. **(D)** Análisis de la segregación del CrIV-GFP. Las barras de error indican la desviación estándar ($n = 3$). **(E)** Longitud media del huso en los tiempos indicados tras la liberación del bloqueo en G1. Las barras de error indican la SEM ($n = 75$). Se indican las diferencias estadísticamente significativas (***, $P < 0.001$) o no significativas (n.s.) de acuerdo a un test de comparaciones múltiples Student-Newman-Keuls. **(F-G)** Imágenes representativas de células *pMET3-Ub-DHFR-IPL1-3HA CDC20-AID* (**F**; F1940) y *pMET3-Ub-DHFR-IPL1-3HA CDC20-AID mad1Δ* (**G**; F1942). Para cada célula se muestra el huso (Tubulina; verde), el núcleo (DAPI; azul), una imagen de PCM y la imagen combinada del núcleo, el huso y PCM (Merged). Barra de escala = 5 μm .

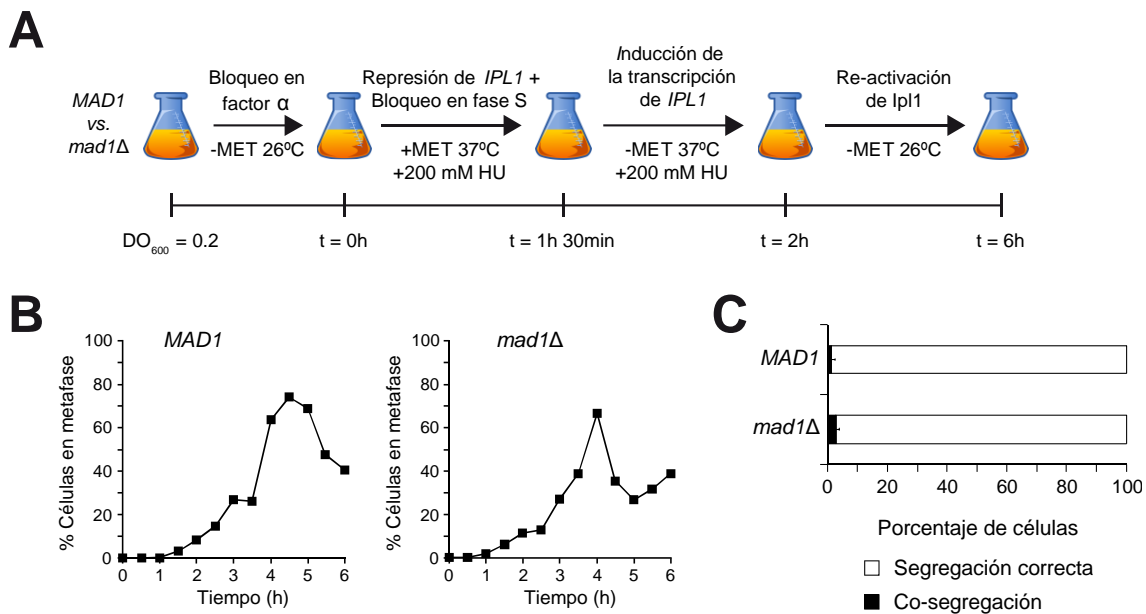


Figura R7. Retraso del inicio de la actividad de Ipl1 hasta fase S. Células *pMET3-Ub-DHFR-IPL1-3HA CDC20-AID* (*MAD1*; F1940) y células *pMET3-Ub-DHFR-IPL1-3HA CDC20-AID mad1Δ* (*mad1Δ*; F1942) con el CrIV-GFP se crecieron y se sincronizaron en G1 haciendo uso de la feromona factor alfa (5 $\mu\text{g/ml}$) en SD-MET a 26°C. Posteriormente, se liberaron en SD con metionina 8 mM e hidroxurea (HU) 200 mM a 37°C. Después de 1,5 h las células se pasaron a SD-MET con HU 200 mM y se cultivaron durante 30 minutos a 37°C. A continuación, las células se liberaron del bloqueo en fase S en SD-MET sin HU a 26°C. **(A)** Diseño experimental. **(B)** Análisis del porcentaje de células en metafase en base a la morfología del huso y del núcleo en los tiempos indicados tras la liberación del bloqueo en G1. **(C)** Análisis de la segregación del CrIV-GFP. Las barras de error indican la desviación estándar ($n = 3$).

3.2 Análisis de las consecuencias del incremento de actividad quinasa Aurora B en *Saccharomyces cerevisiae*

En células de mamífero, el incremento de actividad quinasa Aurora B provoca inestabilidad genómica y problemas de segregación cromosómica (262), activación del SAC (262) e imposibilidad de realizar la citocinesis (231, 263). Además, Aurora B se encuentra sobreexpresada en varios tipos de cáncer y su grado de expresión se ha relacionado con una peor prognosis (236). Sin embargo, al inicio de esta Tesis Doctoral se desconocían los mecanismos moleculares que conducen a estos fenotipos. A este desconocimiento contribuía el hecho de que la sobreexpresión de Ipl1 en *S. cerevisiae*, organismo en el que se ha desarrollado gran parte del conocimiento sobre Aurora B, no da lugar a ningún fenotipo aparente y no interfiere con la viabilidad celular (71). De este modo, y para explicar las consecuencias del incremento de actividad quinasa Aurora B en el ciclo celular, nos planteamos desarrollar un modelo de levaduras que pudiese reproducir los fenotipos asociados a la sobreexpresión de Aurora B en metazoos.

3.2.1 La sobreexpresión de Ipl1 y Sli15 es letal en células de levadura

Ipl1 forma parte del complejo pasajero del cromosoma (CPC) junto a otras subunidades no-enzimáticas que controlan tanto su actividad quinasa como su localización y función (155). Uno de los componentes no-enzimáticos fundamentales del CPC es Sli15 (el homólogo de INCENP en humanos), que se ha descrito como el elemento de andamiaje del complejo y que tiene un papel clave en la localización y actividad de Ipl1 (75). Este papel clave de Sli15 podría explicar que el aumento en los niveles de expresión de *IPL1* no determine problemas en las células de levadura ya que, si sus niveles de expresión son limitantes, el exceso de Ipl1 no podría activarse ni se localizarse correctamente.

De este modo, decidimos evaluar los efectos de la sobreexpresión conjunta de *IPL1* y *SLI15* sobre la segregación cromosómica y la viabilidad celular. Para ello, se generaron estirpes de levadura que contenían una copia adicional de ambos genes bajo el control del promotor regulable *pGAL1-10* (*pGAL*). El promotor *pGAL* se activa en presencia de galactosa y se reprime en presencia de glucosa en el medio de cultivo. La rafinosa no conlleva ni represión ni inducción de dicho promotor, por lo que este azúcar se usó como fuente de carbono para favorecer el crecimiento de las estirpes de levaduras sin afectar la expresión de los genes clonados bajo el control de *pGAL*. El análisis de los niveles de ARNm mediante PCR cuantitativa indicó que las células *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15* mostraban niveles incrementados de expresión de *IPL1* y *SLI15* en condiciones de inducción del promotor *pGAL* (89 veces en el caso de la expresión de *IPL1* y 110 veces en el caso de *SLI15*). Remarcablemente, y de acuerdo con nuestra predicción inicial, la sobreexpresión simultánea de *IPL1* y *SLI15* se correlacionaba con un aumento de actividad quinasa, como demostraba el incremento en los niveles de fosforilación en la serina 10 de la histona H3 (Figura R8A), una modificación de la cromatina que depende de la actividad Aurora B (150).

Una vez comprobado que la sobreexpresión conjunta de *IPL1* y *SLI15* conduce a un incremento en la actividad quinasa de Ipl1, analizamos cómo interfiere este aumento con la viabilidad celular. De acuerdo a lo descrito previamente, la sobreexpresión de *IPL1* no afectaba a la viabilidad celular (71), mientras que el incremento de expresión de *SLI15* tenía un ligero efecto sobre el crecimiento de las células (Figura R8B). No obstante, la sobreexpresión simultánea de *IPL1* y *SLI15* conducía a letalidad celular, siendo las células totalmente inviables en placas que contenían galactosa (Figura R8B). La pérdida de viabilidad celular de la estirpe *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15* en condiciones de sobreexpresión podría deberse a una variación en la estequiometría del complejo CPC. Para estudiar esta posibilidad, analizamos los efectos de la sobreexpresión de Bir1 (el homólogo de Survivina), otro de los componentes no enzimáticos del CPC (76). La sobreexpresión de Bir1 no afectaba a la viabilidad celular y no tenía un efecto aditivo junto con la

sobreexpresión de Ipl1 o Sli15 (Figura R8B). Además, el incremento en los niveles de expresión de Bir1 no era capaz de suprimir la letalidad causada por la sobreexpresión conjunta de Ipl1 y Sli15 (Figura R8B). Por tanto, nuestros resultados sugieren que la pérdida dramática de viabilidad asociada al aumento de expresión de *IPL1* y *SLI15* se debe de forma específica al aumento de actividad quinasa de Ipl1.

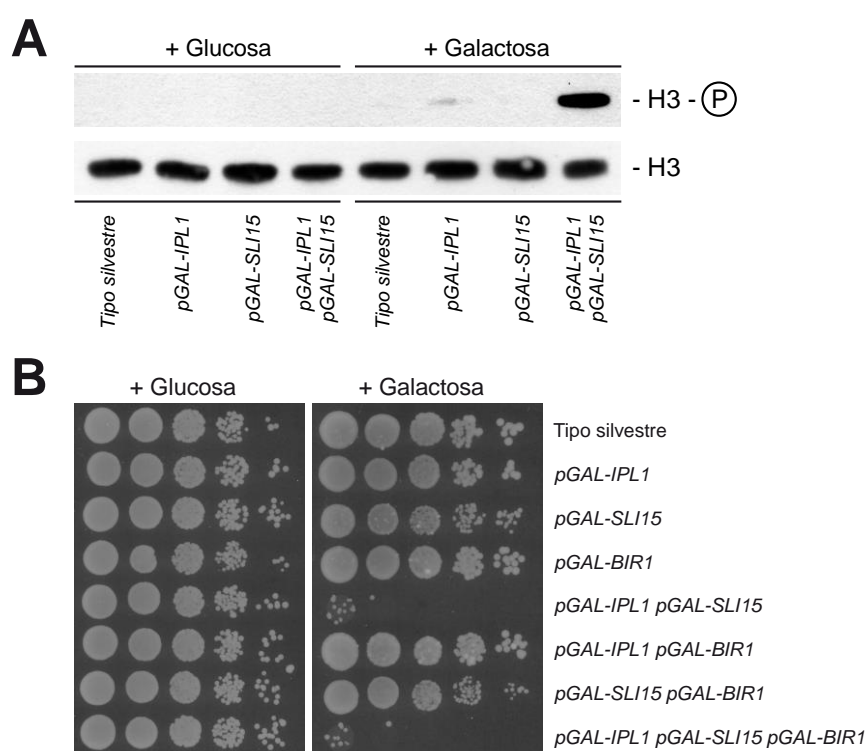


Figura R8. La sobreexpresión simultánea de Ipl1 y Sli15 afecta la viabilidad celular.

(A) Células de tipo silvestre (F955) y células de los mutantes *pGAL-IPL1* (F256), *pGAL-SLI15* (F953) y *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15* (F947) se crecieron en YPA-Raf, se sincronizaron en G1 haciendo uso de la feromona factor alfa (5 µg/ml), y se liberaron en YPA-Gal o en YPAD a 26°C. Se muestra el análisis Western de los niveles de H3 total y H3 fosforilada en la serina 10 (H3-P) en muestras tomadas 60 minutos después de la liberación del bloqueo en G1. **(B)** Células silvestres (F955) y células de los mutantes *pGAL-IPL1* (F256), *pGAL-SLI15* (F953), *pGAL-BIR1* (F1640), *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15* (F947), *pGAL-IPL1 pGAL-BIR1* (F1644), *pGAL-SLI15 pGAL-BIR1* (F1642) y *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15 pGAL-BIR1* (F1646) se crecieron en YPA-Raf a 26°C. La viabilidad celular se determinó mediante un test de diluciones seriadas en placas de YPAD e YPA-Raf/Gal incubadas a 26°C.

3.2.2 Los niveles incrementados de Ipl1 y Sli15 provocan inestabilidad del huso y un bloqueo en el ciclo celular

En la división de *S. cerevisiae*, la aparición de la gema tiene lugar al final de la fase G1 e implica que la célula ha pasado el punto de control START, que regula la transición G1/S. La célula hija crece continuamente durante las fases S y M hasta que alcanza un tamaño similar al de la célula madre (264). Por tanto, el tamaño de la célula hija con respecto a la madre es un marcador útil de progresión del ciclo celular. Haciendo uso de este marcador, y con el fin de estudiar con más detalle los efectos de la sobreexpresión de Ipl1 y Sli15, evaluamos las consecuencias del incremento de actividad quinasa Ipl1 sobre la progresión del ciclo celular (Figura R9A). Las células que sobreexpresaban individualmente Ipl1 o Sli15 avanzaban por el ciclo de manera similar a las del tipo silvestre (Figura R9B). Así, la mayoría de estas células mostraban una gema pequeña aproximadamente 45-60 minutos tras entrar sincrónicamente en el ciclo celular. Transcurridos 90 minutos, las células pasaban a exhibir una gema grande. Finalmente, se llevaba a cabo la citocinesis y, unos 150 minutos después de iniciar el ciclo, se observaba de nuevo una acumulación de células sin gemar. A diferencia de lo que ocurría con las células anteriores, y a pesar de que las células con niveles incrementados tanto de Ipl1 como de Sli15 entraban de manera sincrónica en el ciclo aparentemente sin problemas (como muestra la acumulación de células con gema pequeña aproximadamente a los 45-60 minutos), el mutante *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15* no era capaz de salir de mitosis en condiciones de inducción del promotor *pGAL*, produciéndose una acumulación de células con gema grande (Figura R9B).

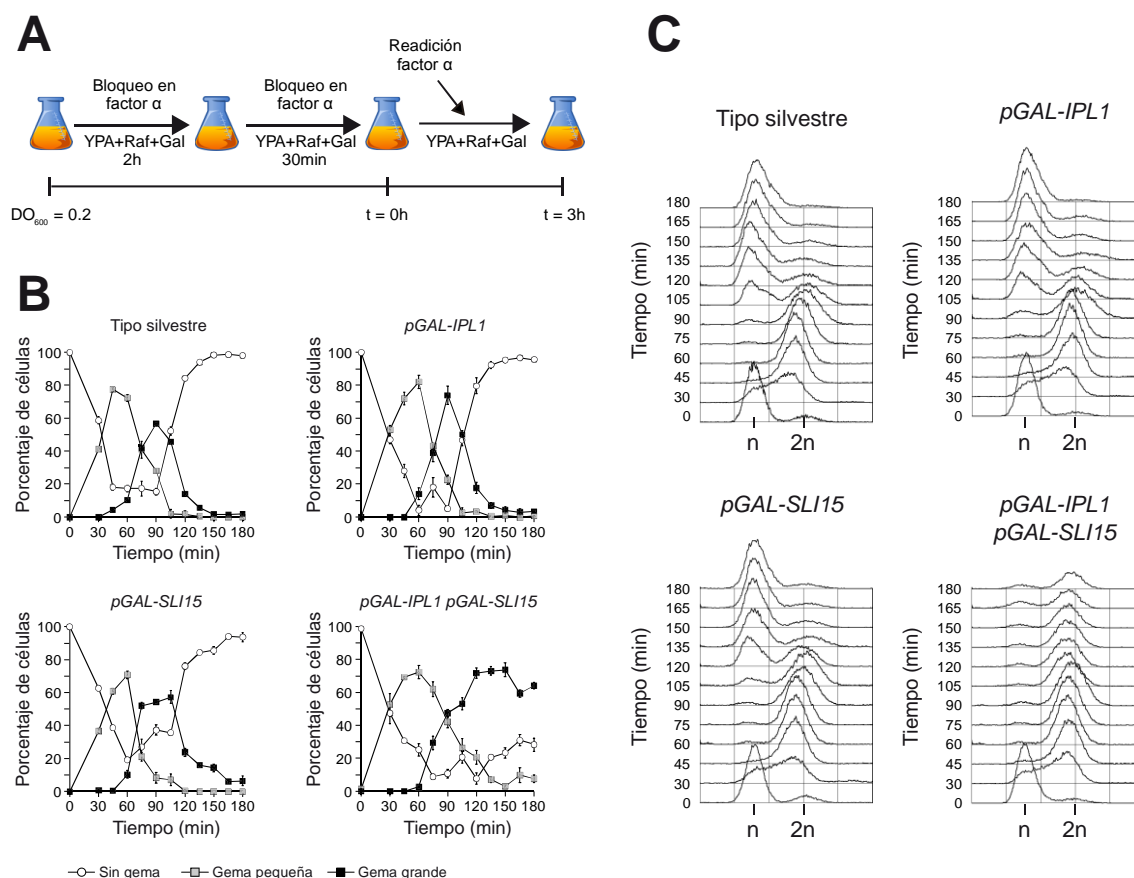


Figura R9. La sobreexpresión de Ipl1 y Sli15 determina un bloqueo del ciclo celular. Células del tipo silvestre (F955) y células de los mutantes *pGAL-IPL1* (F256), *pGAL-SLI15* (F953) y *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15* (F947) se crecieron durante toda la noche en YPA-Raf a 26°C. Al día siguiente, las células se sincronizaron en G1 haciendo uso de la feromona factor alfa (5 μ g/ml). Media hora antes de ser liberadas de este bloqueo, se añadió galactosa a una concentración final del 2%. Una vez sincronizadas en G1, las células se liberaron en YPA-Raf/Gal sin feromona, y se reañadió factor alfa (5 μ g/ml) una vez que se producía la gemación para impedir la entrada en un nuevo ciclo. **(A)** Diseño experimental. **(B)** Análisis de la progresión del ciclo celular en base al tamaño de la gema. Se muestran los porcentajes de células sin gema, con gema pequeña y gema grande en los tiempos indicados después de la liberación del bloqueo en G1. Las barras de error indican la desviación estándar (n = 3). **(C)** Análisis del contenido de ADN mediante citometría de flujo en los tiempos indicados tras la liberación del bloqueo en G1.

El tamaño de la gema, si bien da una idea general de la progresión del ciclo celular, no permite distinguir entre las distintas fases del mismo. Por ello, es necesario usar marcadores adicionales que posibiliten definir con mayor exactitud la fase del ciclo en la que se encuentran las células. Así, y en primer lugar, analizamos la variación

Resultados

del contenido genómico a lo largo del ciclo celular mediante citometría de flujo, con el fin de comprobar si existían problemas durante la replicación del ADN. El análisis del contenido de ADN mostraba que las células del tipo silvestre, del mutante de sobreexpresión de *Ipl1* y del mutante de sobreexpresión de *Sli15* replicaban completamente su genoma aproximadamente 45 minutos después de la liberación del bloqueo en G1, y más tarde salían de mitosis para acumularse de nuevo como células con un contenido genómico 1N (Figura R9C). El incremento simultáneo de los niveles de expresión de *Ipl1* y *Sli15* no parecía interferir con la replicación del ADN, puesto que al igual que el control silvestre y los mutantes simples de sobreexpresión, el mutante *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15*, en condiciones de inducción del promotor *pGAL*, replicaba completamente su genoma en torno a los 45 minutos tras la liberación. Sin embargo, las células no salían de mitosis y finalmente se acumulaban con un contenido genómico 2N, de acuerdo a lo observado previamente en la cinética de progresión del ciclo celular (Figura R9C).

Una vez comprobada la ausencia de problemas durante la replicación, analizamos la morfología del huso mitótico y del núcleo, que nos permite conocer en qué fase de la mitosis se encuentra cada célula, para evaluar con más detalle cómo progresan las células por el ciclo. Las células de la estirpe silvestre y de los mutantes *pGAL-IPL1* y *pGAL-SLI15*, en condiciones de inducción del promotor *pGAL*, mostraban un huso y un núcleo con morfologías típicas de metafase aproximadamente a los 75 minutos tras su liberación del bloqueo en G1. Posteriormente, alrededor de los 90 minutos, las células elongaban completamente el huso y alcanzaban anafase (Figura R10A). Finalmente, se producía el desensamblaje del huso y las células salían de mitosis (Figura R10A y R11A). En condiciones de sobreexpresión, el mutante *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15* tampoco mostraba defectos en la entrada del ciclo celular, de acuerdo con los datos anteriores, y alcanzaba metafase en torno a los 75 minutos sin ningún problema obvio. Sin embargo, las células con actividad *Ipl1* incrementada experimentaban dificultades cuando intentaban extender el huso para dar lugar a la segregación de los cromosomas. A partir de este punto, en estas células empezaban a evidenciarse

problemas, observándose menos de un 10% de células con una morfología de huso típica de anafase (Figura R10A). En la mayor parte de los casos, una vez iniciaban su extensión, se producía una debilitación del huso mitótico, especialmente en la zona media, tras lo cual el huso finalmente colapsaba (Figura R10A, R10D y R11B). A pesar de ello, la mayoría de las células conseguían distribuir sus cromosomas entre las células madre e hija, como demostraba la aparición de masas de DAPI separadas (Figura R10D). Para confirmar los problemas observados en cuanto a la estabilidad del huso, cuantificamos la longitud máxima del mismo durante su elongación. La longitud del huso mitótico varía a lo largo del ciclo celular, de forma que en cada fase presenta una medida característica. Así, en metafase, el huso muestra una longitud media de 1,5-2 μm y en anafase temprana unas 5-6 μm , siendo su máxima longitud en anafase tardía, fase en la que mide en torno a 10 μm . Es importante señalar que estas longitudes son aproximadas, pues dependen del fondo genético de la levadura empleada y del equipo usado para las mediciones (265). Con el fin de comprobar si la variación de los niveles de expresión de Ipl1 y Sli15 afectaba a la capacidad de elongación máxima del huso, se midió su longitud en anafase en células con masas de DAPI separadas (anafase tardía; Figura R10C). La longitud media máxima del huso era de 9 μm en las células del tipo silvestre y en las células que sobreexpresaban Ipl1, reduciéndose hasta aproximadamente 4 μm en las que poseían una expresión incrementada tanto de Ipl1 como de Sli15 (Figura R10B). Aunque la longitud máxima se veía ya ligeramente afectada con la sobreexpresión individual de Sli15 (Figura R10B), en este caso la zona media del huso no parecía debilitarse.

Resultados

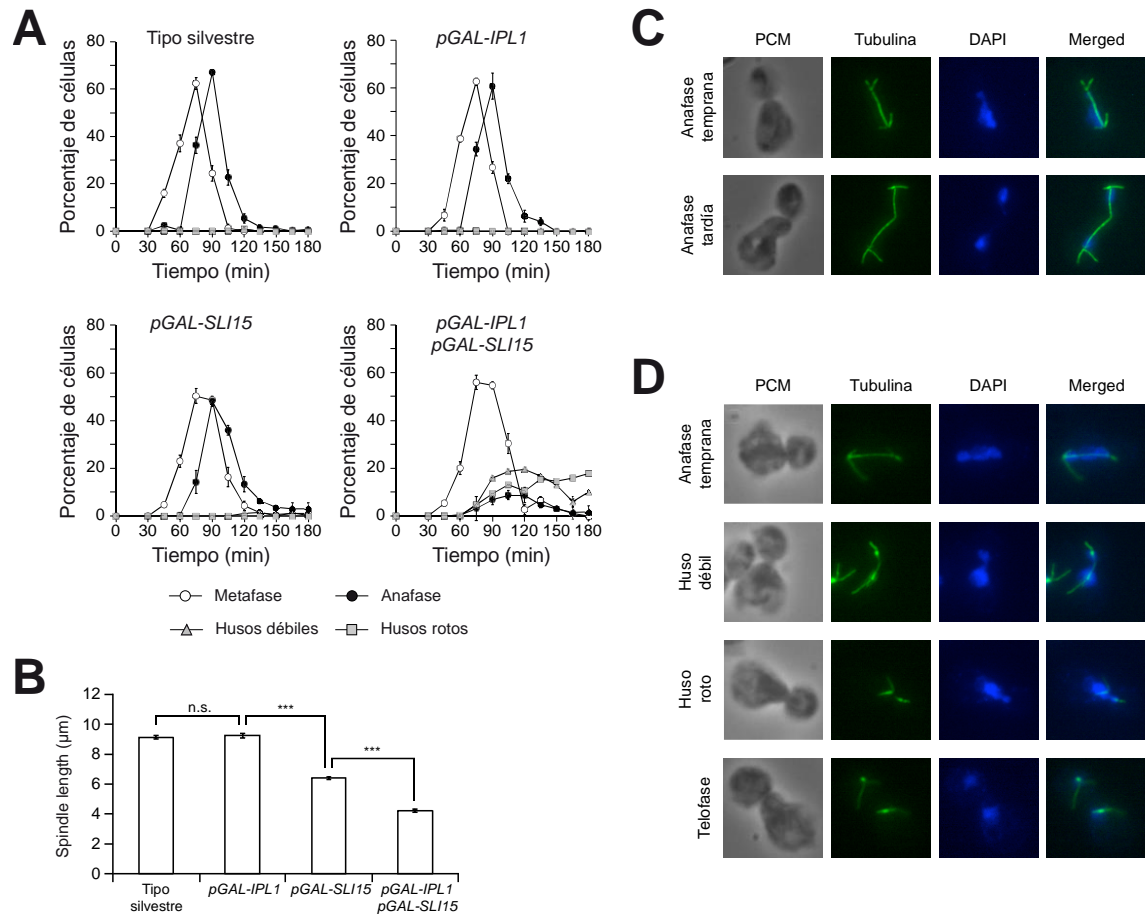


Figura R10. Análisis de la progresión del ciclo celular tras la sobreexpresión de Ipl1 y Sli15. Células del tipo silvestre (F955) y células de los mutantes *pGAL-IPL1* (F256), *pGAL-SLI15* (F953) y *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15* (F947) se bloquearon en G1 haciendo uso de la feromona factor alfa y se liberaron de manera sincrónica en medio YPA-Raf/Gal a 26°C (siguiendo el diseño experimental de la Figura R9A). **(A)** La progresión del ciclo celular se analizó en base a la morfología del huso y del núcleo. Se representan los porcentajes de células en metafase y anafase, así como de células con un huso debilitado por la zona media y con un huso roto en los tiempos indicados tras la liberación del bloqueo en G1. Las barras de error indican la desviación estándar (n = 3). **(B)** Longitud máxima promedio del huso en células con los núcleos segregados. Las barras de error indican la SEM (n = 150). Se reflejan las diferencias estadísticamente significativas (***) o no significativas (n.s.) de acuerdo a un test t de dos colas. **(C y D)** Imágenes representativas de células del tipo silvestre **(C; F955)** y del mutante *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15* **(D; F947)**. En cada imagen se muestra el huso (Tubulina; verde), el núcleo (DAPI; azul), una imagen de PCM y una imagen combinada del núcleo y el huso (Merged).

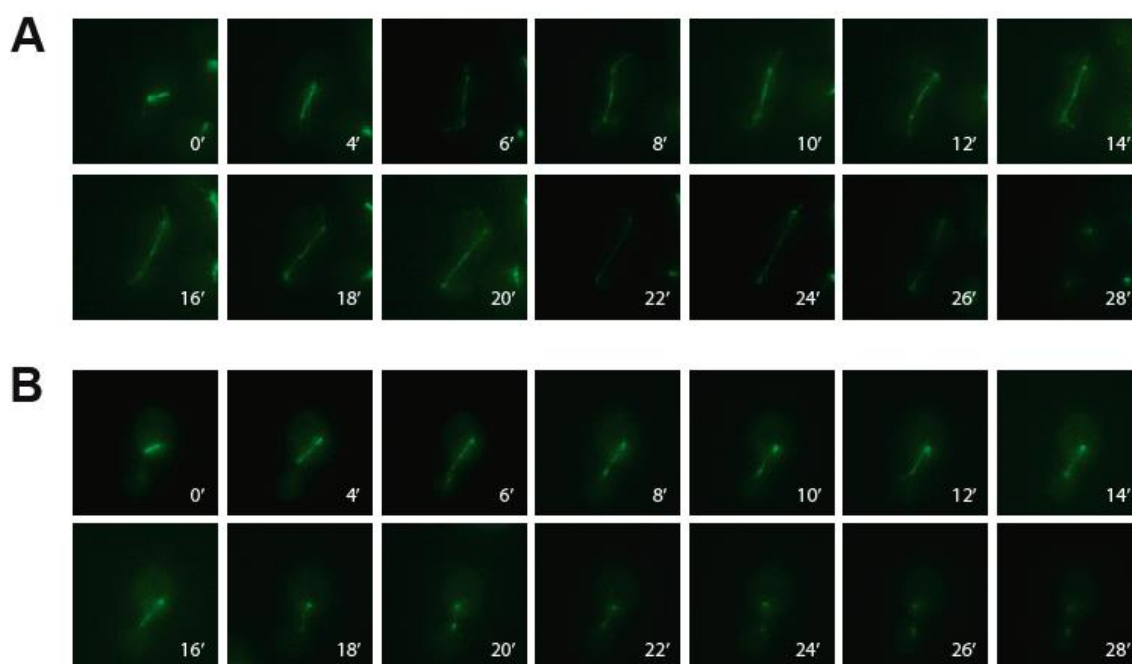


Figura R11. Análisis de la elongación del huso mitótico mediante microscopía en tiempo real. Células del tipo silvestre (**A**; F1570) y células del mutante *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15* (**B**; F1803) con una versión marcada de Tub1 (Tub1-GFP) se crecieron en placas con medio S-Raf/Gal y se tomaron imágenes cada dos minutos. Se muestran imágenes de la proyección máxima de una serie de 7 secciones espaciadas 0,78 μm en el eje z.

3.2.3 La sobreexpresión de Ipl1 y Sli15 conduce a problemas graves de segregación cromosómica

En células de mamífero se había descrito que el incremento de actividad quinasa Aurora B genera aneuploidías e inestabilidad genómica (262). En base a esto, decidimos estudiar si nuestro modelo de actividad incrementada de Ipl1 muestra también problemas de segregación cromosómica. Con este fin, se siguió la segregación de una versión marcada con GFP del cromosoma IV (CrIV-GFP). En células silvestres, tras la segregación de los cromosomas en anafase, podían distinguirse dos masas de DAPI separadas, de aproximadamente el mismo tamaño. De acuerdo con una correcta distribución de los cromosomas, cada masa de DAPI mostraba un punto verde de GFP, correspondiente a una de las cromátidas hermanas del cromosoma IV (Figura R12A y R12B). El incremento de expresión de

Resultados

IPL1 o *SLI15* de forma individual no afectaba a la segregación cromosómica. Sin embargo, las células *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15*, en condiciones de inducción del promotor *pGAL*, cosegregaban ambas cromátidas hermanas hacia una misma célula casi en todos los casos (Figura R12A y R12B). Además, y a diferencia de lo que ocurre en las células con actividad *Ipl1* reducida, en las que la cosegregación de las cromátidas hermanas se produce preferencialmente hacia la célula hija, las células con incremento de expresión de *Ipl1* y *Sli15* mostraban un ligero sesgo en la segregación de ambas cromátidas hermanas hacia la célula madre. Para verificar que los problemas de segregación observados no eran específicos del cromosoma IV, evaluamos también la segregación cromosómica en células que portaban una versión marcada con GFP del cromosoma V (CrV-GFP), siguiendo la misma estrategia de marcaje que para el CrIV-GFP. Este análisis demostraba que, de manera importante, el patrón de segregación de este cromosoma era similar al del cromosoma IV, tanto en células del tipo silvestre como en las células del mutante *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15* en condiciones de sobreexpresión (Figura R12C).

Con objeto de demostrar que los defectos observados en la progresión a lo largo del ciclo y en la segregación de los cromosomas en el mutante *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15* en condiciones de sobreexpresión se deben realmente al incremento de actividad de *Ipl1*, hicimos uso del alelo *ipl1-D227A*, carente de actividad quinasa (266). La sobreexpresión conjunta del alelo *ipl1-D227A* y *SLI15* conducía a letalidad celular (Figura R13A), pero a diferencia de los fenotipos asociados al incremento de expresión de *Ipl1* y *Sli15*, dichas células presentaban un comportamiento parecido al de las células con actividad *Ipl1* reducida: salían de mitosis, no presentaban inestabilidad en el huso y segregaban incorrectamente los cromosomas alrededor del 70% de las ocasiones, con un patrón diferente al obtenido para el incremento de actividad quinasa *Ipl1* (Figura R13B, R13C y R13D). Estos fenotipos eran similares a los causados por la sobreexpresión individual de *ipl1-D227A*. La sobreexpresión de este alelo, por tanto, actúa de forma dominante negativa. En resumen, podemos concluir que, en las células con niveles elevados de *Ipl1* y *Sli15*, tanto el patrón de segregación cromosómica como los

problemas en la progresión a lo largo del ciclo y con la estabilidad del huso son dependientes del incremento de actividad quinasa Ipl1.

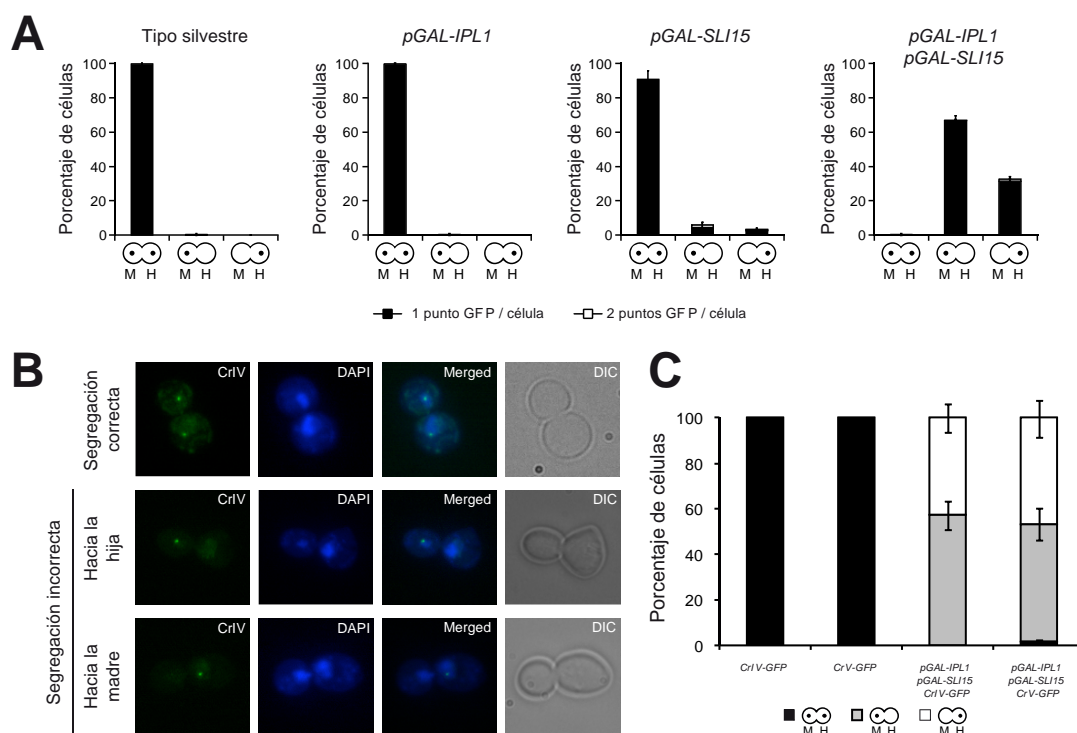


Figura R12. La sobreexpresión de Ipl1 y Sli15 provoca defectos en segregación cromosómica.

(A y B) Células del tipo silvestre (F955) y células de los mutantes *pGAL-IPL1* (F256), *pGAL-SLI15* (F953) y *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15* (F947) con el CrIV-GFP se sincronizaron en G1 haciendo uso de la feromona factor alfa y se liberaron en YPA-Raf/Gal (siguiendo el diseño experimental de la Figura R9A). **(A)** Análisis de la segregación del CrIV-GFP. Los gráficos de barras indican el porcentaje de células que segregaron las cromátidas correctamente (células con un punto fluorescente en la madre (M) y otro en la hija (H)) o que cosegregaron las cromátidas hacia la célula madre (un punto o dos puntos fluorescentes sólo en la célula madre) o hacia la hija (un punto o dos puntos fluorescentes sólo en la gema). Las barras de error indican la desviación estándar ($n = 3$). **(B)** Imágenes representativas de los diferentes patrones de segregación en las que se muestra el CrIV-GFP (verde), el ADN (DAPI; azul), una imagen de DIC, así como una imagen combinada del ADN y el CrIV-GFP (Merged). **(C)** Células del tipo silvestre (F955) y células del mutante *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15* (F1906) con el CrIV-GFP así como células del tipo silvestre (F1359) y células del mutante *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15* (F1901) con el CrV-GFP se sincronizaron en G1 haciendo uso de la feromona factor alfa y se liberaron en YPA-Raf/Gal (siguiendo el diseño experimental de la Figura R9A). Análisis de la segregación del CrIV-GFP o CrV-GFP. Los gráficos de barras indican el porcentaje de células que segregaron las cromátidas hermanas correctamente o que las cosegregaron bien hacia la célula madre o hacia la hija. Las barras de error indican la desviación estándar ($n = 3$).

Resultados

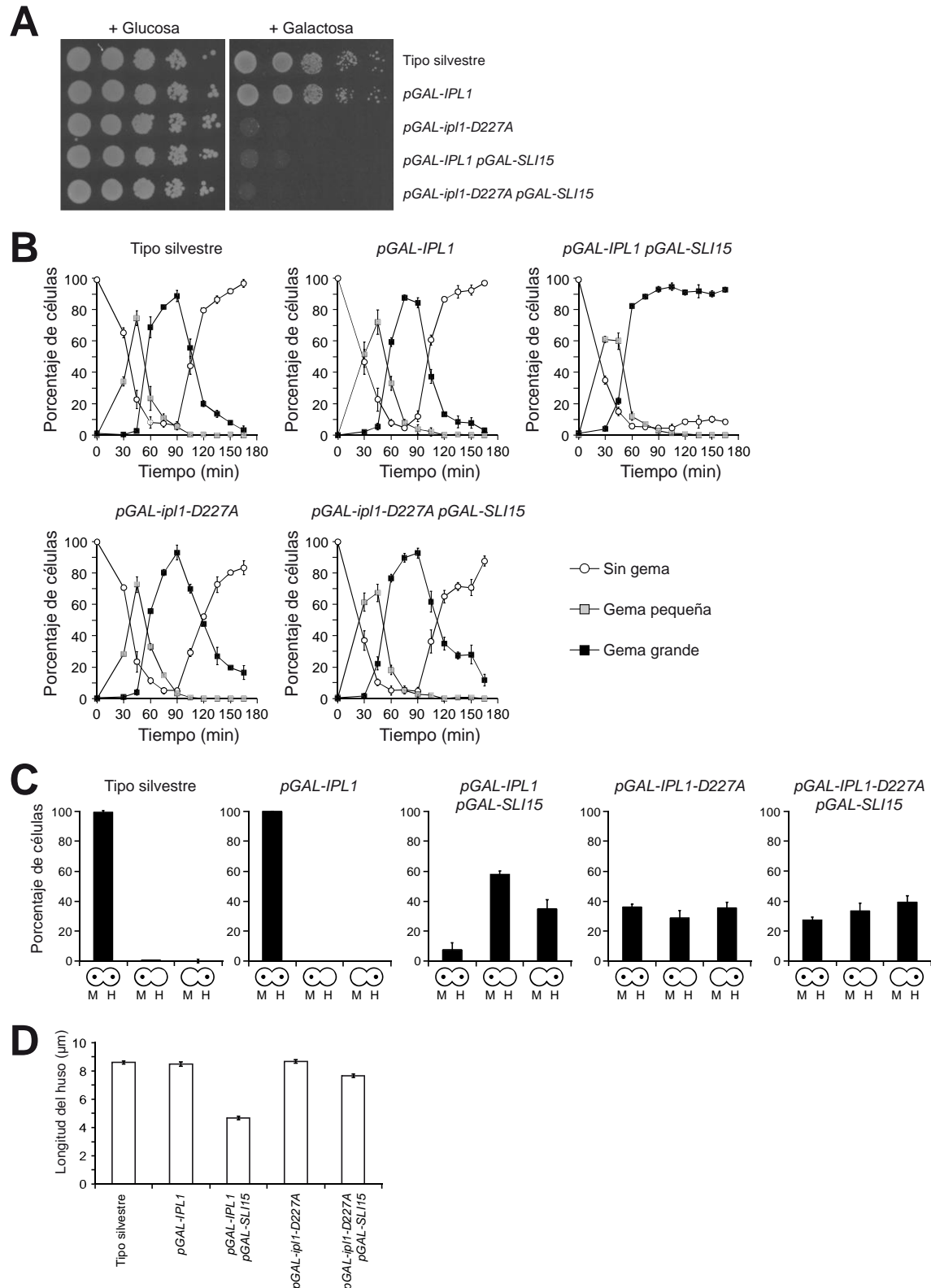


Figura R13. Los fenotipos asociados a la sobreexpresión de *Ipl1* y *Sli15* son dependientes de la actividad quínasa. Células del tipo silvestre (F955) y células de los mutantes *pGAL-IPL1* (F256), *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15* (F947), *pGAL-ipl1-D227A* (F2008) y *pGAL-ipl1-D227A pGAL-SLI15* (F2021)

con el CrIV-GFP se crecieron en YPA-Raf a 26°C. **(A)** Análisis de la viabilidad mediante test de diluciones seriadas en placas de YPAD e YPA-Raf/Gal incubadas a 26°C. **(B)** Las células se sincronizaron en G1 haciendo uso de la feromona factor alfa y se liberaron en YPA-Raf/Gal (siguiendo el diseño experimental de la Figura R9A). Se muestran los porcentajes de células sin gema, con gema pequeña y con gema grande en los tiempos indicados tras la liberación del bloqueo en G1. Las barras de error indican la desviación estándar ($n = 3$). **(C)** Análisis de la segregación del CrIV-GFP. Los gráficos de barras indican si las cromátidas hermanas han segregado correctamente o han cosegregado, bien hacia la célula madre (M) o bien hacia la hija (H). Las barras de error indican la desviación estándar ($n = 3$). **(D)** Promedio de la longitud máxima del huso en células con los núcleos segregados. Las barras de error indican la SEM ($n = 150$).

Los resultados anteriormente expuestos demuestran que el incremento de actividad quinasa generado por la sobreexpresión simultánea de Ipl1 y Sli15 en *S. cerevisiae* recapitula los problemas de segregación cromosómica asociados al incremento de actividad quinasa Aurora B en células de mamífero. El incremento de actividad Ipl1 observado en levaduras tras a la sobreexpresión de *IPL1* y *SLI15* a partir del promotor *pGAL* es tan elevado que impide la viabilidad celular. El hecho de que la sobreexpresión de *IPL1* y *SLI15* ocasione fenotipos tan drásticos supone una ventaja para intentar definir los mecanismos moleculares que conducen a los fenotipos asociados al incremento de actividad quinasa Aurora B en células de mamífero. No obstante, y si bien en el caso de células tumorales se han descrito tumores con niveles de expresión de *AURK-B* similares o incluso superiores a los observados en nuestro modelo de levaduras (267, 268), lo más común es encontrar niveles de expresión menos elevados (269). Decidimos verificar, por tanto, si también en *S. cerevisiae* un aumento menos acusado de los niveles de expresión de Ipl1 y Sli15 también conduce a un incremento en inestabilidad genómica. Para ello, se clonaron los genes *IPL1* y *SLI15* bajo su propio promotor y se integraron en el genoma de la levadura, de forma que conseguimos una estirpe con una duplicación de los genes *IPL1* y *SLI15* (*2xIPL1 2xSLI15*). Las células *2xIPL1 2xSLI15* no mostraban problemas de viabilidad celular evidentes, lo que sugería la ausencia de defectos graves de segregación cromosómica. Por ello, llevamos a cabo un ensayo de pérdida de plásmido, que permite comprobar defectos de segregación cromosómica más sutiles. Los resultados de este análisis demostraron que incluso

Resultados

la duplicación de *IPL1* y *SLI15* conllevaba un aumento considerable de la inestabilidad genómica, en base al elevado porcentaje de pérdida de plásmido observado en el mutante *2xIPL1 2xSLI15* en relación a la estirpe silvestre (Figura R14).

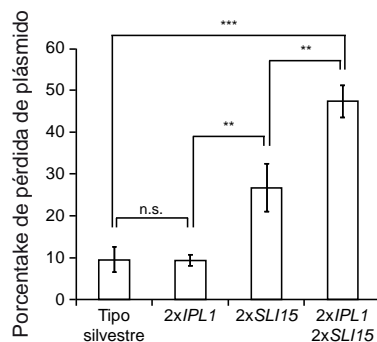


Figura R14. La duplicación de los genes *IPL1* y *SLI15* provoca un incremento en la inestabilidad genómica. Ensayo de pérdida de plásmido con células del tipo silvestre (F496) y células con dos copias de *IPL1* (*2xIPL1*; F1753), dos copias de *SLI15* (*2xSLI15*; F1754) o dos copias de ambos genes (*2xIPL1 2xSLI15*; F2019) transformadas con el plásmido pRS316. El gráfico muestra la mediana de los valores y las desviaciones estándar de tres test de fluctuación para cada estirpe; cada test se llevó a cabo con seis colonias independientes. Se presentan las diferencias significativas (** $P < 0.001$ y ** $P < 0.01$) o no significativas (n.s.) de acuerdo a un test t de dos colas.

3.2.4 Los problemas de segregación causados por el incremento de expresión de Ipl1 y Sli15 no dependen del aumento en la fosforilación de la serina 10 de la histona H3

La fosforilación de la serina 10 de la histona H3 (H3S10) ocurre durante mitosis en un amplio rango de eucariotas, y parece tener un papel en la condensación y la segregación de los cromosomas, aunque su función sigue siendo muy debatida (270-273). En cultivos celulares, se ha demostrado que la sobreexpresión de Aurora B provoca inestabilidad en el número de cromosomas, relacionada con un incremento en la fosforilación del residuo histónico en cuestión (262). Conociendo estos datos, y dado que la elevación en los niveles de expresión de Ipl1 y Sli15 conduce a un incremento en la fosforilación de la serina 10 de la histona H3,

quisimos evaluar si la hiperfosforilación de este residuo podría estar relacionada con la pérdida de viabilidad y el incremento en la inestabilidad genómica asociados a la sobreexpresión conjunta de *IPL1* y *SLI15*. Con este fin, generamos un mutante en el que se deletionó una de las dos copias del gen que codifica la histona H3, mientras que en la otra copia el residuo serina 10 se sustituyó por alanina para impedir su fosforilación (*H3S10A*). La expresión incrementada de *Ipl1* y *Sli15* conducía a letalidad celular tanto en las células *H3S10A* como en las células que sobreexpresaban *Ipl1* y *Sli15* pero en las que no se había mutado la histona H3 (Figura R15A). Por otra parte, el análisis de la segregación cromosómica mostraba que, en condiciones de sobreexpresión, las células *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15 H3S10A* segregaban incorrectamente los cromosomas en la mayoría de los casos, con un patrón similar al obtenido para el mutante *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15* en las mismas condiciones (Figura R15B). A la luz de estos resultados puede concluirse que los problemas de viabilidad celular y de segregación cromosómica generados por la sobreexpresión de *Ipl1* y *Sli15* no se asocian al incremento de fosforilación de *H3S10*.

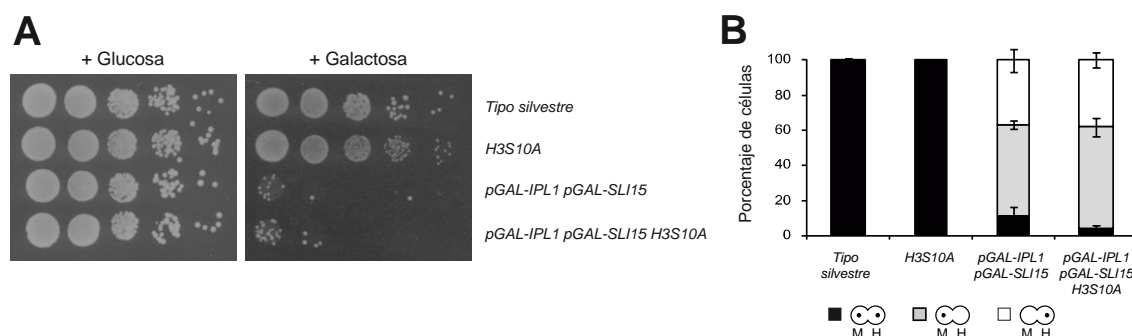


Figura R15. Los problemas de segregación cromosómica asociados a la sobreexpresión de *Ipl1* y *Sli15* no dependen del incremento de fosforilación en la serina 10 de la histona H3. (A y B) Células del tipo silvestre (F1989) y células de los mutantes *H3S10A* (F1988), *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15* (F2002) y *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15 H3S10A* (F2010) con el CrIV-GFP se cultivaron en YPA-Raf a 26°C. (A) Análisis de la viabilidad celular mediante test de diluciones seriadas en placas de YPAD e YPA-Raf/Gal incubadas a 26°C. (B) Análisis de la segregación del CrIV-GFP de células en anafase en medio YPA-Raf/Gal a 26°C. Los gráficos de barras indican si las cromátidas hermanas han segregado correctamente o han cosegregado bien hacia la célula madre (M) o bien hacia la hija (H). Las barras de error indican la desviación estándar (n = 3).

3.2.5 La sobreexpresión de Glc7 no revierte los fenotipos asociados al incremento de actividad Ipl1

La fosfatasa de serina/treonina PP1 (Proteína Fosfatasa 1) muestra funciones opuestas a las de Aurora B, entre otros aspectos, en la regulación de la segregación cromosómica. Los genomas de la mayoría de los eucariotas estudiados contienen múltiples genes que codifican PP1. Sin embargo, en *S. cerevisiae*, esta fosfatasa sólo es codificada por el gen *GLC7* (274). Durante la regulación de la segregación de los cromosomas, Ipl1 y Glc7 muestran actividades antagónicas en el control de la fosforilación de las proteínas del cinetocoro en levaduras (al igual que sus ortólogos en mamíferos) (131, 275, 276). En base a esta función antagónica, analizamos si el incremento de actividad fosfatasa Glc7 era capaz de aliviar los fenotipos asociados al incremento de actividad quinasa Ipl1. Para ello, se clonó en el mutante *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15* una copia adicional de *GLC7*, también bajo el control del promotor *pGAL*. Las células *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15 pGAL-GLC7* son inviables en condiciones de inducción del promotor *pGAL* (Figura R16A), es decir, la sobreexpresión de Glc7 no suprimía la letalidad asociada al incremento de actividad Ipl1. Las células que sobreexpresaban Ipl1, Sli15 y Glc7 progresaban por el ciclo de manera similar a como lo hacían las células del mutante *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15* en medio con galactosa y, al igual que estas, no eran capaces de salir de mitosis (Figura 16B). Además, la segregación de los cromosomas seguía estando afectada en las células con expresión incrementada de Ipl1, Sli15 y Glc7 (Figura R16C). Es importante hacer notar que, puesto que el incremento de expresión de Glc7 por sí sólo es letal, afectando al estado de fosforilación de sustratos no comunes a Ipl1 (277), es difícil evaluar las razones que determinan la letalidad celular de la estirpe *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15 pGAL-GLC7* en condiciones de inducción del promotor. En cualquier caso, y en resumen, nuestros resultados demuestran que el incremento de actividad fosfatasa PP1 no es capaz de revertir la letalidad celular ni los defectos en la progresión a lo largo del ciclo y de segregación cromosómica asociados al incremento de actividad quinasa Ipl1.

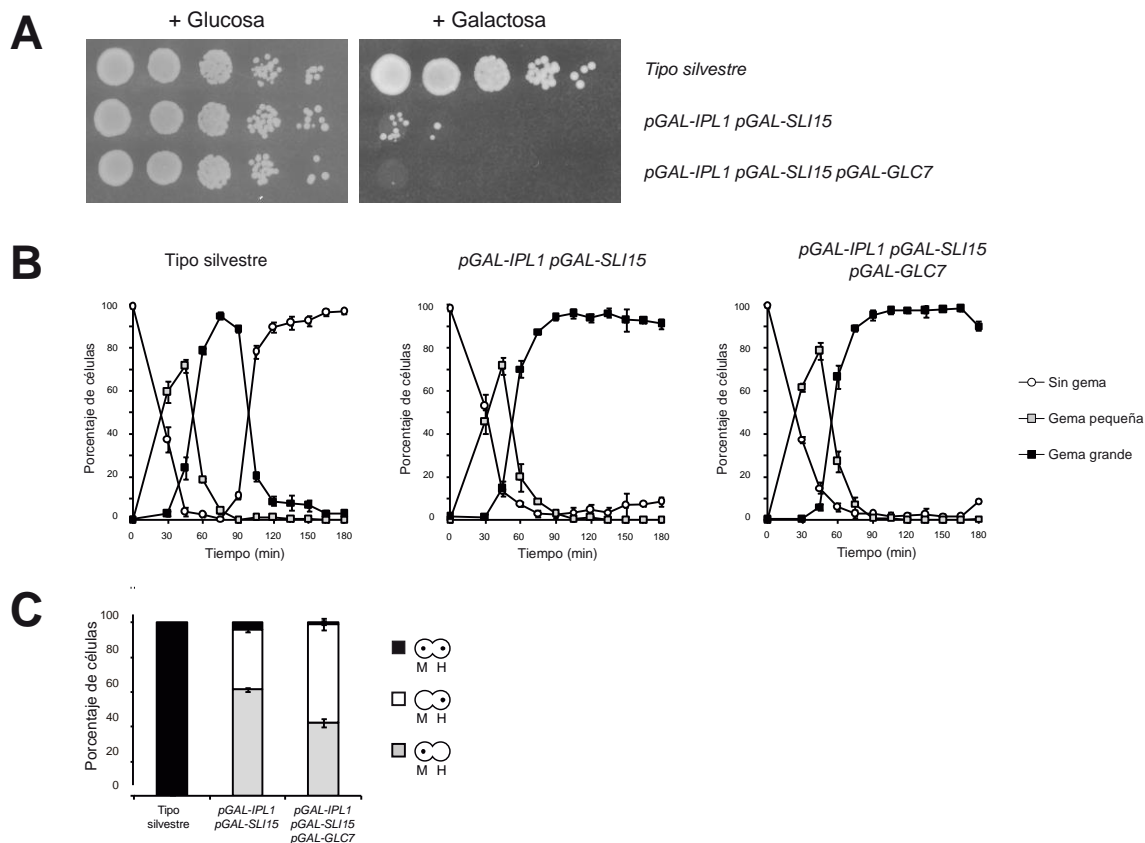


Figura R16. La sobreexpresión de la actividad fosfatasa Glc7 no suprime los fenotipos asociados al incremento de actividad quinasa Ipl1. Células del tipo silvestre (F955) y células de los mutantes *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15* (F947) y *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15 pGAL-GLC7* (F1120) con el CrIV-GFP se cultivaron en YPA-Raf a 26°C. **(A)** Análisis de viabilidad celular mediante test de diluciones seriadas en placas de YPAD e YPA-Raf/Gal incubadas a 26°C. **(B y C)** Las células se sincronizaron en G1 haciendo uso de la feromona factor alfa (5 µg/ml) y se liberaron en YPA-Raf/Gal (siguiendo el diseño experimental descrito en la Figura R9A). **(B)** Análisis de la progresión del ciclo celular mediante el estudio del tamaño de la gema en los tiempos indicados tras la liberación del bloqueo en G1. Las barras de error indican la desviación estándar (n = 3). **(C)** Análisis de la segregación del CrIV-GFP. Los gráficos de barras indican si las cromátidas hermanas han segregado correctamente o han cosegregado bien hacia la célula madre (M) o bien hacia la hija (H). Las barras de error indican la desviación estándar (n = 3).

3.2.6 El incremento de actividad quinasa Ipl1 provoca inestabilidad del huso por alteración de la función de Ase1

La propia inestabilidad del huso mitótico causada por la sobreexpresión de Ipl1 y Sli15 podría estar generando los defectos en segregación cromosómica asociados

al incremento de actividad Ipl1. Para evaluar esta posibilidad, en primer lugar analizamos las causas que determinan el colapso prematuro del huso tras la sobreexpresión de Ipl1 y Sli15, con la finalidad de intentar revertir este fenotipo y comprobar si, de este modo, también se previenen los defectos de segregación cromosómica. La inestabilidad del huso mitótico observada en el mutante *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15* en condiciones de inducción del promotor *pGAL* podría en principio deberse a un fallo en la localización del CPC, debido a que la regulación de la actividad y la localización del complejo están estrechamente relacionadas (76). La elevada señal nuclear observada en células que sobreexpresaban Ipl1 y Sli15 impedía el análisis directo de su localización en el huso. Para solventar este problema, seguimos la localización de otro de los componentes del CPC, Bir1. Al igual que en las células del tipo silvestre, Bir1 se localizaba a lo largo del huso durante la elongación del mismo en las células con incremento de actividad Ipl1 (Figura R17A), indicando que la inestabilidad del huso no es debida a un fallo en la localización del CPC. Alternativamente, el incremento de actividad quinasa Ipl1 podría causar el colapso prematuro del huso interfiriendo con la función de proteínas asociadas a microtúbulos. Un candidato interesante es Ase1, cuya fosforilación por Ipl1 es esencial para el control de la estabilidad y el ensamblaje de la zona media del huso (181, 258). La delección de *ASE1* provoca el colapso prematuro del huso (181), un fenotipo similar al observado en las células del mutante *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15* en condiciones de sobreexpresión. Por ello, investigamos si el incremento de expresión de Ipl1 y Sli15 afectaba a la localización de Ase1. En células del tipo silvestre, Ase1 se asociaba con el huso en metafase, y su localización se restringía a la zona media del huso en anafase (Figura R17B, (181)). Sin embargo, tras el incremento de los niveles de expresión de Ipl1 y Sli15, la localización de Ase1 se reducía en metafase y dicha proteína no se acumulaba en la zona media cuando el huso se elongaba (Figura R17B).

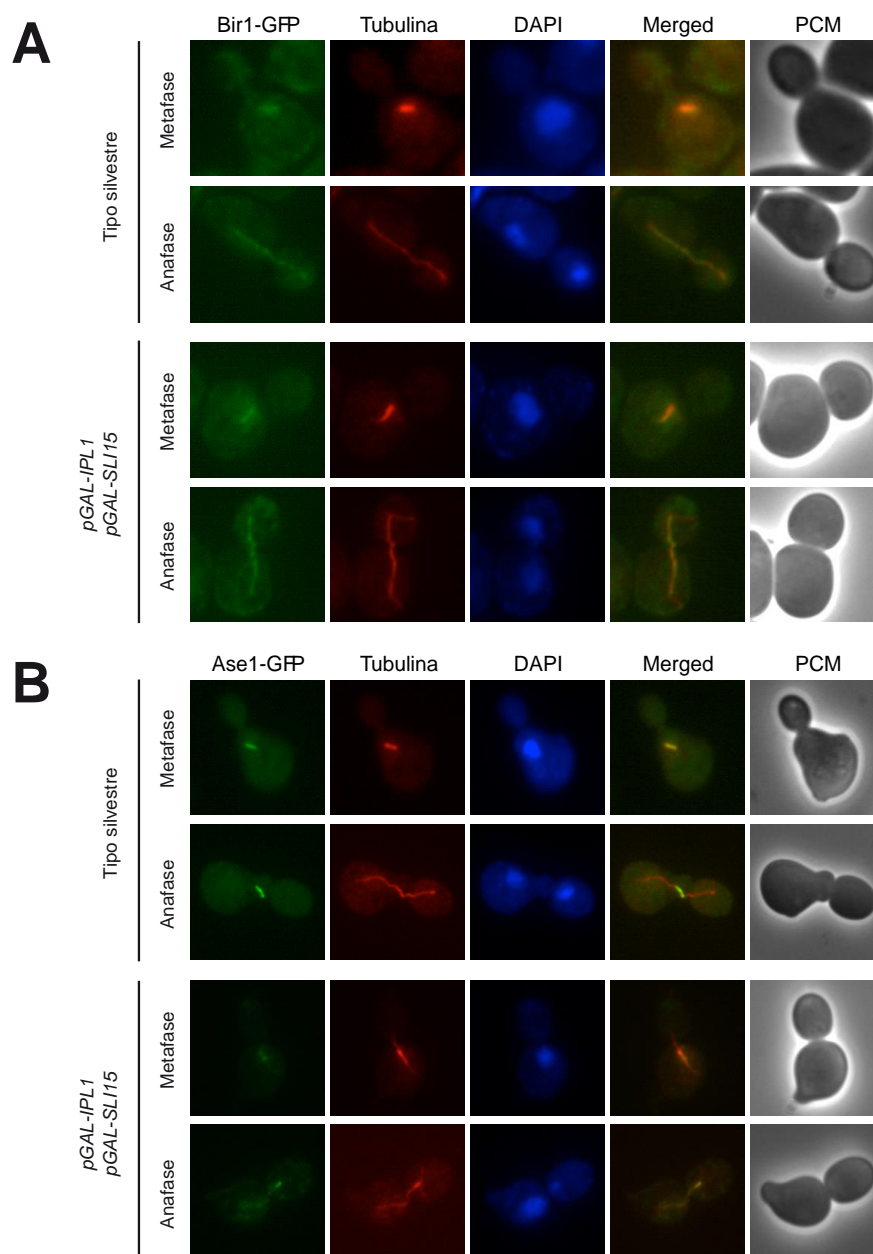


Figura R17. La inestabilidad del huso se debe a fallos en la localización de Ase1 y no del CPC.

(A) Imágenes representativas de células del tipo silvestre (F1357) y células del mutante *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15* (F1611) expresando Bir1-eGFP y Tub1-mCherry en YPA-Raf/Gal a 26°C. Para cada célula se muestra la localización de Bir1-eGFP (Bir1-GFP; verde), Tub1-mCherry (Tubulina; rojo), el ADN (DAPI; azul), una imagen combinada del ADN, la tubulina y Bir1-GFP (Merged) y de PCM. **(B)** Imágenes representativas de células del tipo silvestre (F1951) y células del mutante *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15* (F1982) expresando Ase1-eGFP y Tub1-mCherry en YPA-Raf/Gal a 26°C. Para cada célula se muestra la localización de Ase1-eGFP (Ase1-GFP; verde), Tub1-mCherry (Tubulina; rojo), el ADN (DAPI; azul), una imagen combinada del ADN, la tubulina y Ase1-GFP (Merged) y de PCM.

A continuación, comprobamos si la sobreexpresión de Ipl1 y Sli15 afecta a la función de Ase1, causando de este modo inestabilidad de la zona media del huso. Con este fin, clonamos *ASE1* bajo el control del promotor *pGAL* y evaluamos si la sobreexpresión de este gen podría revertir el colapso prematuro del huso causado por el incremento de expresión de Ipl1 y Sli15. Notablemente, una vez que iniciaban la elongación del huso, y a diferencia de las células que sobreexpresaban Ipl1 y Sli15, las células que adicionalmente sobreexpresaban Ase1 mostraban un huso con una morfología típica de anafase (Figura R18A y R18B). De acuerdo con esta observación, la longitud máxima del huso era similar en células del tipo silvestre y en las células con niveles incrementados de Ipl1, Sli15 y Ase1 (Figura R18C). Tras la elongación del huso, estas últimas células sin embargo no desmontaban dicha estructura, presumiblemente debido a una hiperestabilización de la zona media del huso a causa del aumento de expresión de Ase1 (Figura R18A y R18B). Remarcablemente, y aunque la sobreexpresión de *ASE1* rescataba los problemas de estabilidad del huso, no aliviaba otros fenotipos asociados al incremento de la expresión de Ipl1 y Sli15: las células no podían salir de mitosis (Figura R18A y R27A) y mostraban defectos de segregación cromosómica (Figura R18D). Estos resultados sugieren que el incremento de actividad quinasa de Ipl1 afecta a la función de Ase1 y demuestran que los defectos en la segregación cromosómica provocados por el incremento de actividad quinasa Ipl1 no se deben al colapso prematuro del huso.

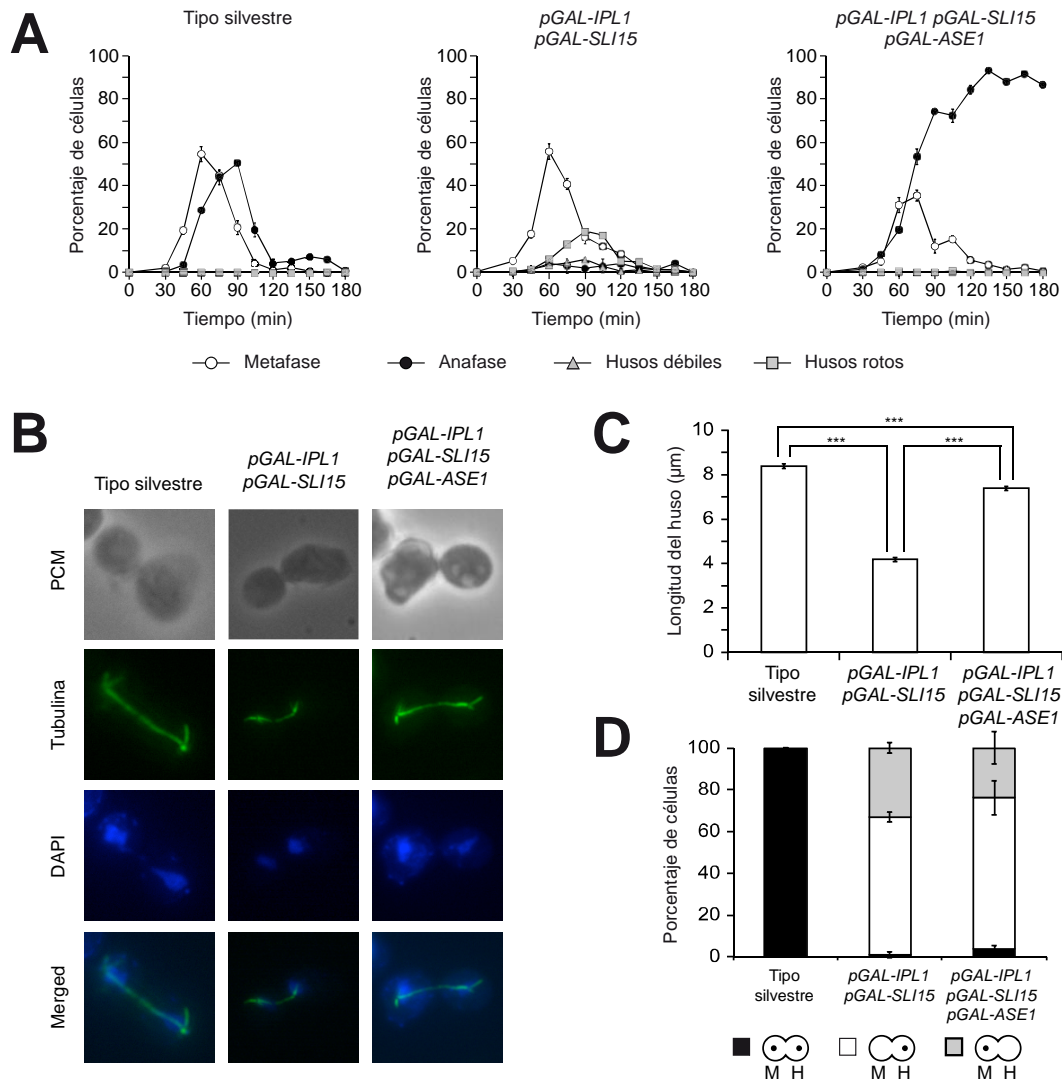


Figura R18. La inestabilidad del huso está asociada a un defecto en la función de Ase1. Células del tipo silvestre (F955) y células de los mutantes *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15* (F947) y *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15 pGAL-ASE1* (F1735) se sincronizaron en G1 haciendo uso de la feromona factor alfa (5 μg/ml) y se liberaron en medio YPA-Raf/Gal (siguiendo el diseño experimental descrito en la Figura R9A). **(A)** Análisis de la progresión del ciclo celular en base a la morfología del huso y del núcleo. Se muestran los porcentajes de células en metáfase, en anafase, con un huso con la zona media debilitada y con un huso roto en los tiempos indicados tras la liberación del bloqueo en G1. Las barras de error indican la desviación estándar (n = 3). **(B)** Imágenes representativas del huso (Tubulina; verde), el núcleo (DAPI; azul), una imagen de PCM y la combinación del huso y el núcleo (Merged). **(C)** Promedio de la longitud máxima del huso en células con los núcleos segregados. Las barras de error indican la SEM (n = 180). Se presentan las diferencias estadísticamente significativas (***) de acuerdo a un test t de dos colas. **(D)** Análisis de la segregación del CrIV-GFP. Se muestran los porcentajes de células que han segregado correctamente las cromátidas hermanas o las han cosegregado bien hacia la célula madre (M) o bien hacia la hija (H). Las barras de error representan la desviación estándar (n = 3).

La falta de estabilidad de la zona media del huso provocada por la sobreexpresión simultánea de Ipl1 y Sli15 podría ser reminiscente del defecto en la elongación del huso observado en células bloqueadas en metafase y en las que las cohesinas han sido ectópicamente degradadas. En esas condiciones, como consecuencia de la pérdida de cohesión entre las cromátidas hermanas, el huso intenta elongarse debido a la ausencia de las fuerzas que se generan en las uniones microtúbulo-cinetocoro y que se contraponen a los motores de microtúbulos que separan los SPBs, pero se vuelve inestable (278). De forma similar, el fenotipo de inestabilidad de la zona media asociado al incremento de actividad quinasa Ipl1, más que una regulación incorrecta de Ase1 por Ipl1, podría reflejar un intento de las células de elongar el huso en la fase del ciclo incorrecta, donde las condiciones idóneas para la elongación de este aún no han sido establecidas. Para descartar esta posibilidad, determinamos si, al igual que lo que ocurre en el caso de la sobreexpresión simultánea de Ipl1 y Sli15, la elevación de los niveles de Ase1 era capaz de suprimir el fenotipo de fallos en la elongación del huso observado en células bloqueadas en metafase en las que las cohesinas habían sido deplecionadas. Para ello, se generaron células en las que la expresión tanto de *SCC1* (un componente fundamental del complejo cohesinas) como de *CDC20* se controló mediante el promotor reprimible por metionina *pMET3* y una fusión transcripcional al degrón *Ub-DHFR* inducible por temperatura. Estas células portaban, además, una copia adicional de *ASE1* bajo el control del promotor *pGAL*. Células *pMET3-CDC20* *pMET3-SCC1-18Myc* y células *pMET3-CDC20 pMET3-SCC1-18Myc pGAL-ASE1* se sincronizaron en G1 y se dejaron entrar en el ciclo impidiendo la expresión de *Sccl* y *Cdc20*, de forma que las células se bloqueaban en metafase y en ausencia de cohesinas (Figura R19A y R19B). Una vez en metafase, se indujo la sobreexpresión de Ase1. La mayoría de las células *pMET3-CDC20 pMET3-SCC1-18Myc* mantenían sus husos estables a lo largo de todo el experimento, si bien los husos metafásicos eran más largos que los observados en una estirpe silvestre (esto es, tenían más de 2 μ m de longitud) y aproximadamente sólo el 20% de las células mostraban husos con una zona media debilitada (Figura R19C). No obstante, y lo que es más importante, la sobreexpresión de *ASE1* en las células bloqueadas en metafase en

ausencia de cohesinas no tenía el mismo efecto que en las células que sobreexpresaban Ipl1 y Sli15: aunque se detectaba un ligero aumento de células que conseguían elongar completamente el huso, la mayoría mostraban husos similares a las del experimento control. Además, la sobreexpresión de Ase1 en estas células conducía a la aparición de husos con morfologías aberrantes que no se observaban en las células con niveles endógenos de Ase1 (Figura R19C y R19D). Estos datos apuntan que la inestabilidad del huso observada en células bloqueadas en metafase con las cohesinas deplecionadas y en células que sobreexpresan Ipl1 y Sli15 está provocada por causas diferentes.

Los datos anteriores sugieren que la sobreexpresión conjunta de Ipl1 y Sli15 afecta directamente a la función de Ase1, posiblemente debido a una desregulación de su estado de fosforilación. Para verificar esta posibilidad, estudiamos los niveles de fosforilación de Ase1 mediante análisis Western. El aumento simultáneo de la expresión de Ipl1 y Sli15 provocaba un cambio en la movilidad electroforética de Ase1 en geles SDS-PAGE (Figura 20A), que era eliminado mediante tratamiento con fosfatasa alcalina (Figura R20B), lo cual está de acuerdo con un aumento de fosforilación de Ase1 a causa de la sobreexpresión de Ipl1 y Sli15. Por otro lado, y también de acuerdo a nuestra hipótesis, la expresión en el mutante de sobreexpresión de Ipl1 y Sli15 del alelo *ase1-5A*, en el que cinco sitios consenso de fosforilación de Ipl1 son mutados a alanina (258), reducía el porcentaje de células con una zona media del huso debilitada y recuperaba parcialmente la longitud máxima del huso (Figura R20C). Curiosamente, y a diferencia de lo que ocurría con las células que sobreexpresaban Ipl1, Sli15 y Ase1, el huso finalmente colapsaba en las células *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15 ase1-5A* en condiciones de sobreexpresión. No obstante, se ha demostrado que Ipl1 es todavía capaz de fosforilar la proteína Ase1-5A *in vitro* (258), por lo que el fosfomutante podría seguir siendo parcialmente regulado por esta quinasa. En resumen, nuestros resultados sugieren que el incremento simultáneo de los niveles de expresión de Ipl1 y Sli15 provoca el desensamblaje prematuro del huso mitótico interfiriendo con la función de Ase1 directamente a través de su hiperfosforilación.

Resultados

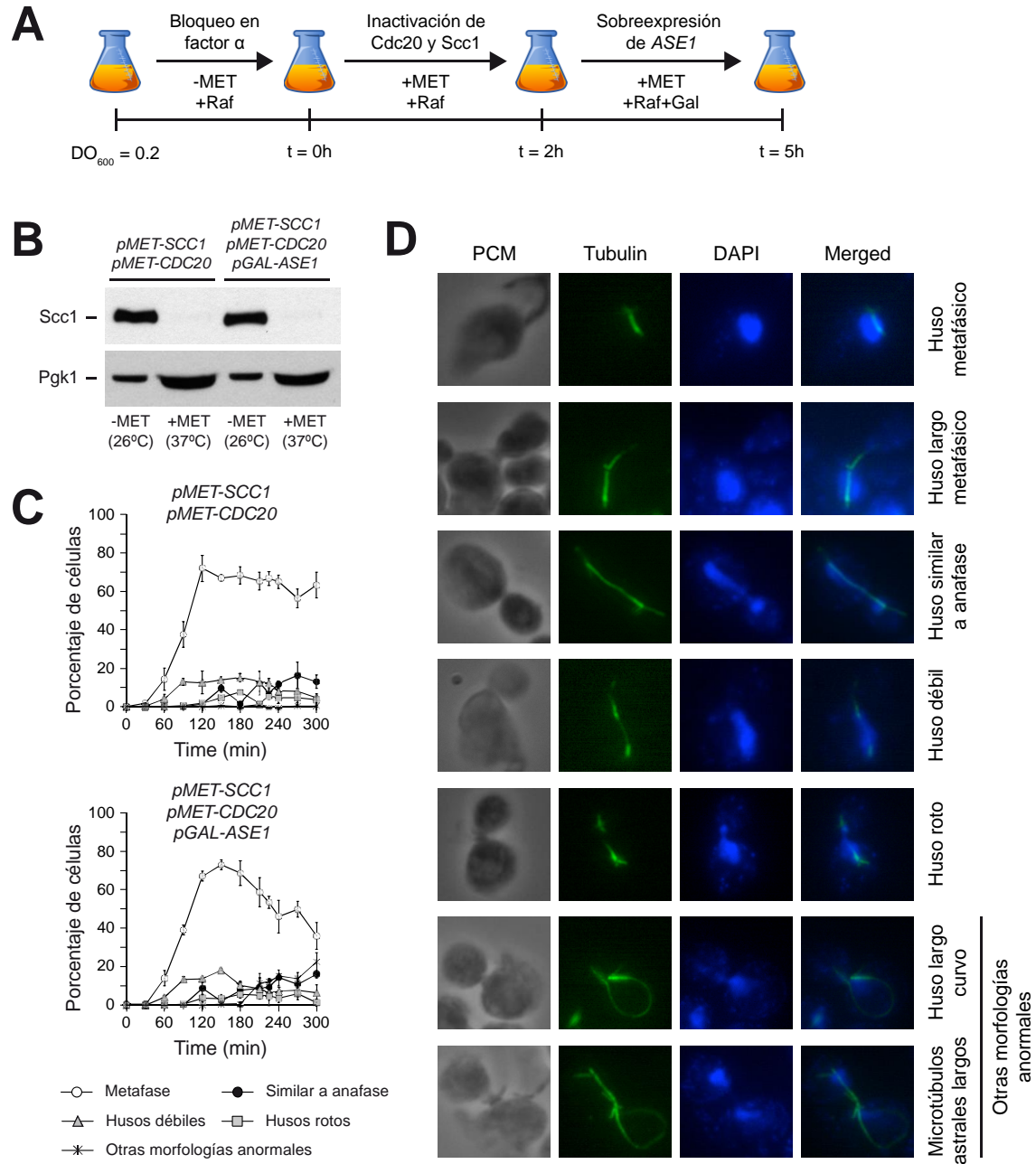


Figura R19. La inestabilidad del huso asociada a la depleción de las cohesinas en células bloqueadas en metafase no está asociada a un defecto de función de Ase1. Células *pMET3-SCC1-18Myc pMET3-CDC20* (F2290) y células *pMET3-SCC1-18Myc pMET3-CDC20 pGAL-ASE1* (F2291) se sincronizaron en G1 con factor alfa (5 μ g/ml) en S-Raf -MET (-MET) a 26°C. Media hora antes de ser liberadas para entrar sincrónicamente en mitosis, se añadió 8mM de metionina y los cultivos se pasaron 37°C. Posteriormente, se liberaron del bloqueo en G1 en S-Raf con 8mM de metionina (+MET) a 37°C, es decir, en condiciones restrictivas para la expresión tanto de *SCC1* como de *CDC20*. Una vez que las células se bloquearon en metafase, se añadió galactosa al 2% para inducir el promotor *pGAL*. **(A)** Diseño experimental. **(B)** Análisis Western de los niveles de Scc1-18Myc antes de liberar las células del bloqueo en G1 (-MET 26°C) y en el punto final del experimento (+MET 37°C). Los niveles de Pgk1 se usaron como control de carga. **(C)** Análisis de la progresión del

ciclo celular en base a la morfología del huso y del núcleo. Se muestran los porcentajes de células en metafase, en anafase y células que poseían husos con la zona media debilitada, rotos y con morfologías aberrantes en los tiempos indicados tras la liberación del bloqueo en G1. Las barras de error indican la desviación estándar ($n = 3$). **(D)** Imágenes representativas de células de las diferentes categorías establecidas en (C). Se muestran imágenes de PCM, del huso (Tubulina; verde), del núcleo (DAPI; azul) y la combinación del núcleo y el huso mitótico (Merged).

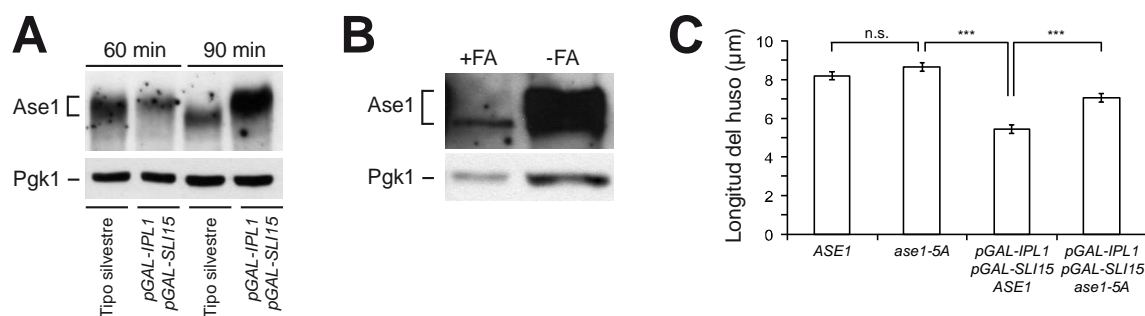


Figura R20. La inestabilidad del huso está asociada al estado de fosforilación de Ase1. **(A y B)** Células del tipo silvestre (F1951) y células del mutante *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15* (F1982) con Ase1-eGFP se sincronizaron en G1 haciendo uso de la feromona factor alfa y se liberaron en YPA-Raf/Gal (siguiendo el diseño experimental descrito en la Figura R9A). **(A)** Análisis Western de Ase1-eGFP 60 y 90 minutos después de la liberación del bloqueo en G1. **(B)** Análisis Western de Ase1-eGFP de las células *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15* (F1982) antes (-FA) y después (+FA) del tratamiento con fosfatasa alcalina. **(A y B)** Los niveles de Pgk1 se usaron como control de carga. **(C)** Células del tipo silvestre (F2299) y células de los mutantes *ase1-5A* (F2289), *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15* (F2300) y *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15 ase1-5A* (F2288) se cultivaron en S-Raf-LEU a 26°C y se sincronizaron en G1 con factor alfa (5 $\mu\text{g/ml}$). Media hora antes de ser liberadas para entrar sincrónicamente en mitosis, se añadió 2% de galactosa para inducir la expresión del promotor *pGAL*. Finalmente, se liberaron en medio S-Raf/Gal-LEU. Se representa el promedio de la longitud máxima del huso en células con los núcleos segregados. Las barras de error indican la SEM ($n = 75$). Se muestran los resultados cuyas diferencias son estadísticamente significativas (***) o no significativas (n.s.) de acuerdo a un test t de dos colas.

3.2.7 El incremento de actividad quinasa Ipl1 causa la desestabilización de las uniones microtúbulo-cinetocoro

Aurora B detecta las uniones microtúbulo-cinetocoro que no conducen a tensión en el huso, y las desestabiliza mediante la fosforilación de componentes del cinetocoro, generando de esta forma cinetocoros vacíos que activan el SAC (70, 131,

256). La bi-orientación de las cromátidas hermanas, y la consecuente tensión en el huso, separa Aurora B de sus dianas en los cinetocoros y estabiliza las uniones de los cromosomas al huso (130, 279). La sobreexpresión de Ipl1 y Sli15 podría conducir a la acumulación del homólogo de Aurora B en los centrómeros. De esta forma, se generaría una situación artificial en la que la quinasa está más próxima a sus sustratos en los cinetocoros, no estableciéndose el gradiente de fosforilación necesario para la segregación correcta de los cromosomas por Ipl1. Para evaluar esta posibilidad, estudiamos la localización de Ipl1 mediante preparaciones de cromosomas mitóticos (*"chromosome spreads"*). Con este fin, usamos versiones marcadas de Ipl1 (Ipl1-6HA para el alelo endógeno y Ipl1-3HA en el caso de la copia sobreexpresada) y de la proteína del cinetocoro Ndc80 (Ndc80-GFP). De acuerdo a nuestra hipótesis, la señal de Ipl1 en los cinetocoros era más intensa tras la sobreexpresión conjunta de Ipl1 y Sli15 que en las células del tipo silvestre (Figura R21A). Además, y al contrario de lo que ocurre en células del tipo silvestre, la localización de Ipl1 en los centrómeros se podía observar incluso después de que la segregación de los cromosomas hubiera tenido lugar (Figura R21A).

Esta acumulación de Ipl1 en los centrómeros podría estar provocando la disrupción de las uniones microtúbulo-cinetocoro incluso cuando los cromosomas están correctamente bi-orientados. Si las conexiones microtúbulo-cinetocoro están siendo eliminadas en presencia de altos niveles de actividad quinasa incluso en el caso de que las uniones sean anfitélicas, los problemas de segregación cromosómica deberían mantenerse aun cuando el incremento de expresión de Ipl1 y Sli15 se produjera en metafase, después del establecimiento de la bi-orientación. Para verificar esta hipótesis, hicimos uso del alelo de *CDC20* reprimible por metionina (*pMET-CDC20*) en células *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15*. Usando este alelo, las células se bloquearon en metafase en condiciones de represión tanto del promotor *pMET* como del promotor *pGAL*, manteniendo de este modo niveles de Ipl1 y Sli15 endógenos. Una vez que todas las células habían alcanzado metafase, y por consiguiente se había garantizado la bi-orientación de los cromosomas, se permitió a las células progresar a lo largo del ciclo en condiciones de inducción del

promotor *pGAL* (Figura R21B). El análisis de la segregación cromosómica reveló que las células *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15* segregaban incorrectamente los cromosomas incluso cuando ambos genes se sobreexpresaban después de alcanzar metafase (Figura R21C).

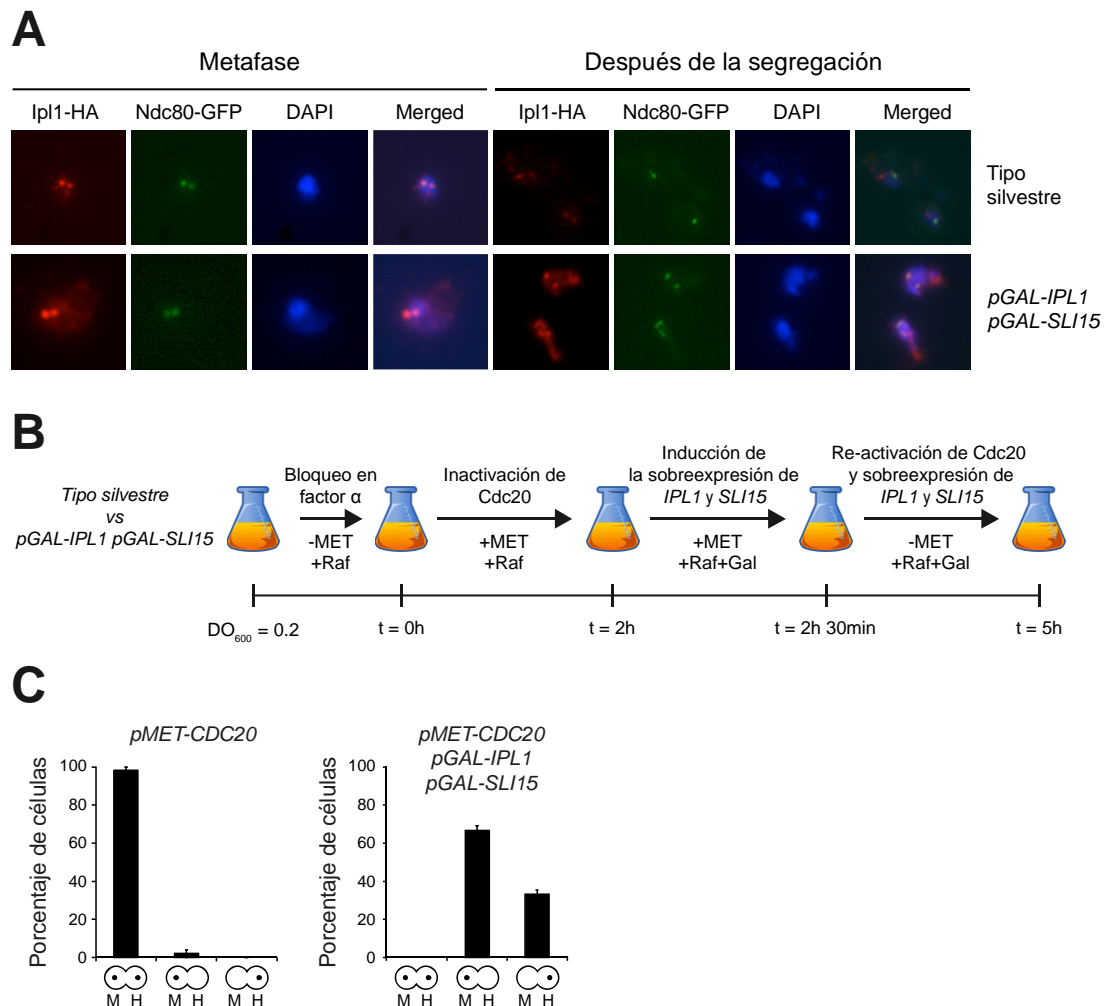


Figura R21. El incremento de expresión de Ipl1 y Sli15 provoca la desestabilización continua de las uniones microtúbulo-cinetocoro. (A) Células del tipo silvestre (F302) y células del tipo silvestre *pGAL-IPL1-3HA pGAL-SLI15* (F2263) expresando Ipl1-6HA y Ndc80-GFP se sincronizaron en G1 haciendo uso de la feromona factor alfa y se liberaron en YPA-Raf/Gal siguiendo el diseño experimental descrito en la Figura R9A. Se muestran imágenes representativas de la localización de Ipl1 (Ipl1-HA; rojo), Ndc80 (Ndc80-GFP; verde), el núcleo (DAPI; azul) y una imagen combinada de Ipl1, Ndc80 y el núcleo (Merged) para células en metafase y tras la segregación de los cromosomas. **(B y C)** Células *pMET-CDC20* (F1670) y células *pMET-CDC20 pGAL-IPL1 pGAL-SLI15* (F1948) con el CrIV-GFP se crecieron en S-Raf-MET a 26°C y se sincronizaron en G1 haciendo uso de la feromona

Resultados

factor alfa (5 µg/ml). Tras la liberación de G1, se bloquearon en metafase en S-Raf con 8 mM de Metionina. Una vez bloqueadas en metafase, se liberaron en S-Raf/Gal-MET y se tomaron muestras hasta que las células finalizaban el ciclo. **(B)** Diseño experimental. **(C)** Análisis de la segregación del CrIV-GFP. Se muestran los porcentajes de células que han segregado correctamente las cromátidas hermanas o las han cosegregado bien hacia la célula madre (M) o bien hacia la hija (H). Las barras de error indican la desviación estándar (n= 3).

Si las uniones microtúbulo-cinetocoro están siendo continuamente desestabilizadas, sería esperable que la distancia entre los centrómeros y los SPBs se incrementase después de la elongación del huso, ya que la falta de unión de los cinetocoros a los microtúbulos haría que los cromosomas, que normalmente permanecen cerca de los SPBs, se separen temporalmente de ellos. Para probar esta predicción, hicimos uso de una versión marcada con GFP del centrómero del cromosoma IV (CrIV-GFP) y una versión marcada con la proteína fluorescente mCherry de Spc42 (Spc42-mCherry), un componente de la placa central de los SPBs (280). Remarcablemente, tras la inducción de la sobreexpresión de Ipl1 y Sli15, la distancia media entre los centrómeros y los SPBs aumentaba con respecto a las células control (Figura R22A). De forma destacada, el incremento de actividad quinasa Ipl1 provocaba incluso la aparición de cromosomas que se separaban del resto durante la elongación del huso (*"lagging chromosomes"*) (Figura R22B). Este hecho es particularmente importante, puesto que la hiperactivación de Aurora B en células de mamífero también provoca la aparición de este tipo específico de problemas de segregación cromosómica (262, 281). Otro dato que apoya la hipótesis de que los cromosomas están continuamente siendo desconectados de los microtúbulos y, en consecuencia, también de los SPBs es que las células que sobreexpresaban Ipl1 y Sli15 mostraban múltiples focos de Ndc80-GFP después de la elongación del huso. Por el contrario, en las células del tipo silvestre, los cinetocoros estaban agrupados y podían visualizarse como un único foco de Ndc80-GFP en anafase (Figura R21A).

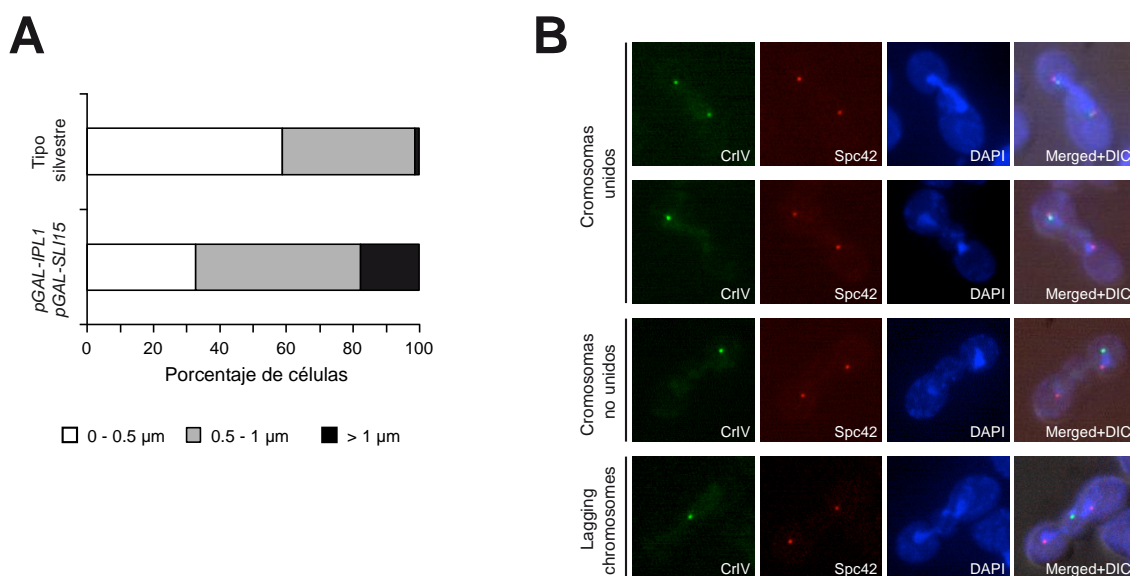


Figura R22. El incremento de la expresión de Ipl1 y Sli15 aumenta la distancia media entre los centrómeros y el SPB más cercano. (A y B) Células del tipo silvestre (F1483) y células del tipo silvestre *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15* (F1417) con el CrIV-GFP y Spc42-mCherry se sincronizaron en G1 haciendo uso de la feromona factor alfa (5 $\mu\text{g/ml}$) y se liberaron en YPA-Raf/Gal siguiendo el diseño experimental descrito en la Figura R9A. **(A)** Cuantificación de la distancia media entre el centrómero del CrIV-GFP y la señal más cercana de Spc42-mCherry (n = 150). **(B)** Imágenes representativas de células con cromosomas unidos a los polos del huso, no unidos y “lagging chromosomes”. Para cada célula se muestra el CrIV (CrIV; verde), el cuerpo polar (Spc42; rojo) y el ADN (DAPI; azul), así como una imagen combinada de DIC, el CrIV, el SPBs y el ADN (Merged+DIC).

Dam1 es un sustrato mitótico clave de Ipl1 en los cinetocoros. Pertenece al complejo DASH, que forma un anillo alrededor de los microtúbulos, y es importante para mantener tanto la integridad del huso como la segregación correcta de los cromosomas (282). Dam1 es fosforilado por Ipl1 para debilitar las uniones microtúbulo-cinetocoro incorrectas, y es desfosforilado una vez que las uniones entre los cromosomas y el huso han sido establecidas de forma anfitélica durante metafase (283). De forma interesante, en el mutante *dam1-D*, que mimetiza la fosforilación constitutiva de Dam1, se observan cromosomas que se quedan separados del resto tras la elongación del huso (131). El análisis de fosforilación de Dam1 mostró que, al contrario de lo que ocurre en las células control, Dam1 se mantenía hiperfosforilado en las células *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15* en condiciones de

Resultados

inducción del promotor *pGAL*, como evidenciaba el cambio de movilidad electroforética de esta proteína en geles SDS-PAGE (Figura R23A), que era eliminado tras el tratamiento con fosfatasa alcalina (Figura R23B). Este aumento de fosforilación de Dam1 es otra indicación adicional que apoya que el incremento de actividad Ipl1 conduce a la desestabilización de las uniones microtúbulo-cinetocoro. De manera interesante, y aunque los niveles de otros sustratos de Ipl1 como la histona H3 o Ase1 no se veían afectados por la sobreexpresión de Ipl1 y Sli15, los niveles de Dam1 parecían reducirse debido a la elevada actividad quinasa Ipl1. Esta disminución en los niveles de Dam1 sugiere la posibilidad de que la proteína se vuelva más inestable tras ser fosforilada por Ipl1.

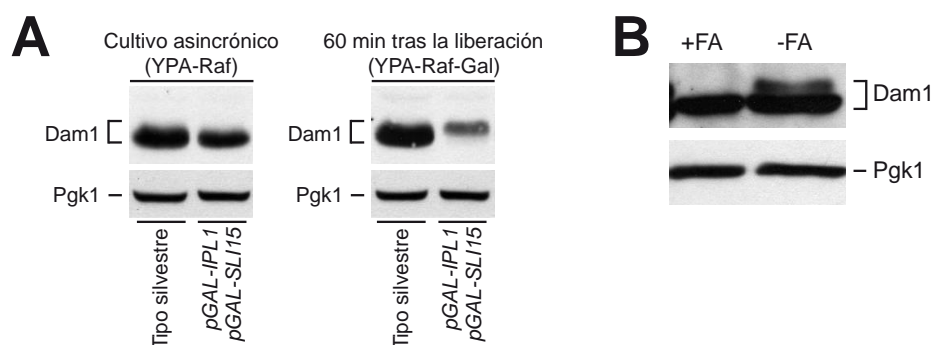


Figura R23. El incremento de actividad de Ipl1 conduce a una hiperfosforilación de Dam1. **(A)** Células del tipo silvestre (F2273) y células del mutante *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15* (F2274) expresando Dam1-3HA se sincronizaron en G1 haciendo uso de la feromona factor alfa y se liberaron en YPA-Raf/Gal (según el diseño experimental descrito en la Figura R9A). Análisis Western de Dam1-3HA en un cultivo asincrónico en YPA-Raf y 60 minutos después de ser liberadas del bloqueo en G1. **(B)** Análisis Western de Dam1-3HA de extractos proteicos de células *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15* (F2274) expresando Dam1-3HA tras 30 minutos de la inducción del promotor *pGAL* después (+FA) y antes (-FA) del tratamiento con fosfatasa alcalina. **(A y B)** Los niveles de Pgk1 se usaron como control de carga.

Por consiguiente, y en conjunto, estos datos sugieren que la sobreexpresión simultánea de Ipl1 y Sli15 conduce a la acumulación de Ipl1 activa en los centrómeros. Esta acumulación impediría el establecimiento del gradiente de fosforilación de Ipl1 en los cinetocoros necesario para la correcta bi-orientación de

las cromátidas hermanas, dando lugar a una disrupción continua de las conexiones microtúbulo-cinetocoro, incluso en el caso de establecerse de manera anfitética.

3.2.8 La expresión incrementada de Ipl1 y Sli15 activa constitutivamente el punto de control de ensamblaje del huso

Si todas las uniones microtúbulo-cinetocoro están continuamente siendo desestabilizadas, las células que sobreexpresan Ipl1 y Sli15 deberían estar exponiendo en todo momento cinetocoros vacíos y, de esta forma, activando permanentemente el SAC. Uno de los primeros pasos en la activación del SAC es la localización de Mad2, un componente de este punto de control, en los cinetocoros que no se encuentran unidos a microtúbulos (31). Para comprobar si la sobreexpresión de Ipl1 y Sli15 provocaba la activación constitutiva del SAC, estudiamos la localización de una versión marcada de Mad2 (Mad2-GFP) usando como marcador del cinetocoro una versión marcada de Ndc80 (Ndc80-CFP). En las células de tipo silvestre en metafase, no se observaba señal de Mad2 en los cinetocoros ni en metafase (Figura R24A) ni en anafase (Figura R24B), de acuerdo con el hecho de que el SAC normalmente se inactiva (o, incluso, no llega a activarse) antes de que las células progresen hasta anafase. Sin embargo, las células que sobreexpresaban Ipl1 y Sli15 mostraban focos de Mad2 que colocalizaban con los cinetocoros durante metafase (Figura R24A) y, de forma más sorprendente, incluso después de que tuviera lugar la segregación de los cromosomas y la elongación del huso (Figura R24B). Estos resultados indican que el incremento de actividad quinasa de Ipl1 conduce a la generación continua de cinetocoros vacíos que determinan una activación constitutiva del SAC.

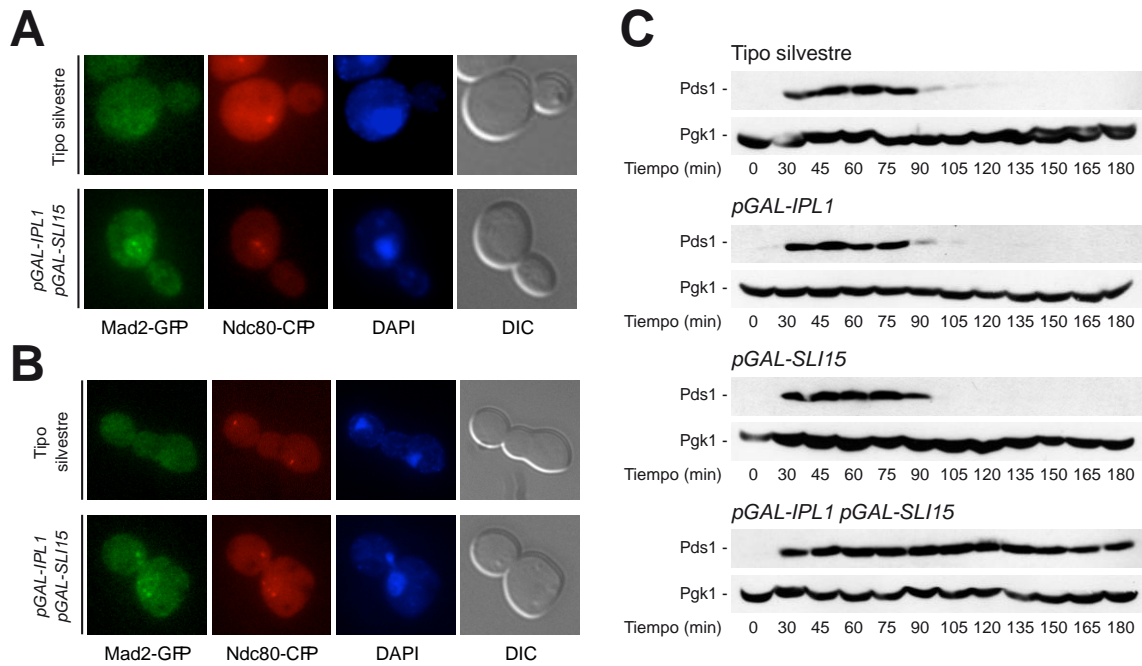


Figura R24. La sobreexpresión de Ipl1 y Sli15 conduce a una activación constitutiva del SAC. **(A y B)** Células del tipo silvestre (F217) y células del mutante *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15* (F1963) expresando Mad2-GFP y Ndc80-CFP se sincronizaron en G1 haciendo uso de la feromona factor alfa (5 µg/ml) y se liberaron en medio YPA-Raf/Gal siguiendo el diseño experimental de la Figura R9A. Imágenes representativas de células en metafase **(A)** y tras la elongación del huso **(B)** en las que se muestra la señal de Mad2 (Mad2-GFP; verde), Ndc80 (Ndc80-CFP; rojo), del ADN (DAPI; azul) y una imagen de DIC. **(C)** Células del tipo silvestre (F144) y células de los mutantes *pGAL-IPL1* (F1191), *pGAL-SLI15* (F1196) y *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15* (F980) expresando Pds1-3HA se sincronizaron en G1 haciendo uso de la feromona factor alfa (5 µg/ml) y se liberaron en YPA-Raf/Gal siguiendo el diseño experimental descrito en la Figura R9A. Análisis Western de Pds1-3HA en los tiempos indicados tras la liberación del bloqueo en G1. Los niveles de Pgk1 se usaron como control de carga.

Tanto la transición metafase-anafase como la salida de mitosis están reguladas por la degradación de proteínas mediante ubiquitinación, y requieren la participación de una ligasa de ubiquitina conocida como el complejo promotor de anafase o ciclosoma (APC/C) (284). El estado de activación del SAC se puede estudiar fácilmente mediante el análisis de los niveles de dos dianas del APC/C: la securina (Pds1, degradada en la transición metafase-anafase) y la ciclina Clb2 (degradada en la salida de mitosis) (285, 286). Las células con niveles incrementados de Ipl1 o de Sli15 mostraban una cinética de degradación de Pds1 similar a la del tipo silvestre

(Figura R24C). Por el contrario, en las células que sobreexpresaban simultáneamente Ipl1 y Sli15, los niveles de Pds1 se mantenían constantes a lo largo de todo el experimento (Figura R24C), al igual que los niveles de Clb2 (Figura R25A). Estos resultados, junto con la localización constitutiva de Mad2 en los cinetocoros, demuestran que el incremento de actividad Ipl1 provoca la disrupción de uniones microtúbulo-cinetocoro, generando continuamente cinetocoros vacíos que activan el SAC. De acuerdo con esta línea argumental, la delección de *MAD1* permitía la degradación de Pds1 y Clb2 en el mutante *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15* en condiciones de inducción del promotor *pGAL* (Figura R25A y R25B). Por otra parte, la activación del SAC no estaba relacionada con la inestabilidad de la zona media del huso observada en las células con incremento de actividad quinasa Ipl1, puesto que las células con expresión incrementada de Ipl1, Sli15 y Ase1 no degradaban Pds1 (Figura R25B).

Pds1 protege a los complejos de cohesinas de ser degradados, manteniendo a las cromátidas hermanas unidas hasta la segregación de los cromosomas (287). Así, una indicación adicional de la activación constitutiva del SAC tras la sobreexpresión de Ipl1 y Sli15, y la consecuente estabilización de Pds1, es que ambas cromátidas hermanas del cromosoma IV permanecían unidas cuando cosegregaban, visualizándose como un único punto de GFP (Figura R12A y R12B). Sin embargo, las dos cromátidas hermanas del cromosoma IV podían observarse como puntos independientes en las células *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15 mad1Δ* en condiciones de inducción del promotor *pGAL* (Figura R26B), indicando que, debido a que Pds1 era degradada (como se demostró anteriormente mediante análisis Western), se producía también la degradación de las cohesinas y la consecuente pérdida de unión de las cromátidas hermanas entre sí.

Resultados

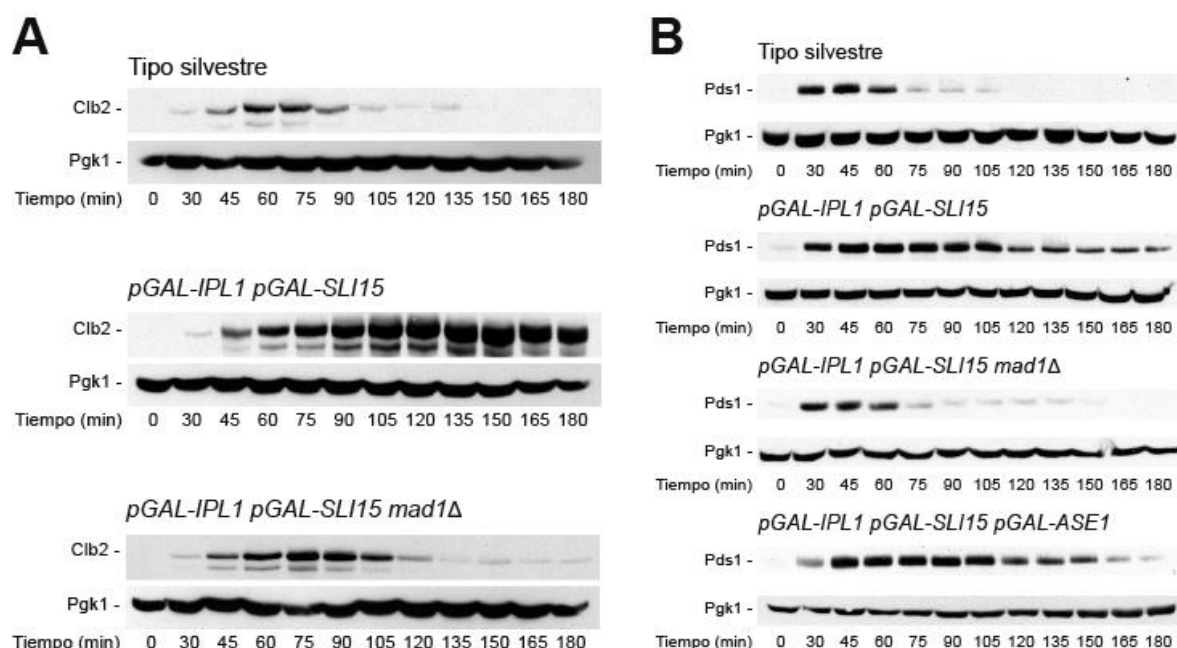


Figura R25. La inactivación del SAC permite la degradación de Pds1 y Clb2 en condiciones de elevada actividad Ipl1. Células del tipo silvestre (F144) y células de los mutantes *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15* (F980), *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15 mad1Δ* (F1376) y *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15 pGAL-ASE1* (F1912) expresando Pds1-3HA se sincronizaron en G1 haciendo uso de la feromona factor alfa (5 µg/ml) y se liberaron en medio YPA-Raf/Gal siguiendo el diseño experimental descrito en la Figura R9A. Análisis Western de Clb2 (**A**) y de Pds1-3HA (**B**) en los distintos tiempos indicados tras la liberación del bloqueo en G1. Los niveles de Pgk1 se usaron como control de carga.

Aunque la expresión incrementada de Ipl1 y Sli15 conduce a problemas graves en la segregación de los cromosomas, la mayoría de las células duplicaban y segregaban correctamente los SPBs durante mitosis, como indicó el análisis de la segregación de una versión marcada de Spc42 (Spc42-mCherry) (Figura R26A). Esto demuestra que los fallos de segregación cromosómica no están asociados a una herencia incorrecta de los SPBs. De manera interesante, sin embargo, la eliminación del SAC en las células con expresión incrementada de Ipl1 y Sli15 conducía a defectos graves en la separación de los SPBs (Figura R26A). Curiosamente, a pesar de la cosegregación de los cuerpos polares en condiciones de inducción del promotor *pGAL*, las células *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15 mad1Δ* mostraban masas de ADN separadas y llevaban a cabo la cariocinesis, como se

evidenció mediante la tinción con DAPI y el marcaje de la envuelta nuclear, haciendo uso de una versión marcada de la nucleoporina Nup159 (Nup159-GFP) (Figura R26B). La explicación más plausible para esta observación es que la activación del SAC provee a las células con el tiempo adicional necesario para configurar el huso metafásico correctamente en presencia de altos niveles de actividad quinasa Ipl1. Por consiguiente, en ausencia del SAC, las células que sobreexpresaban Ipl1 y Sli15 no podían ensamblar el huso correctamente, ambos SPBs eran segregados hacia la misma célula y la mayoría de los cromosomas se quedaban sueltos debido a la desestabilización de las uniones microtúbulo-cinetocoro. De acuerdo con esto, en condiciones de inducción del promotor *pGAL*, las masas de ADN eran desiguales en tamaño en las células *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15 mad1Δ*, y la mayoría del ADN permanecía en la célula opuesta a la que habían cosegregado los SPBs (Figura R26). Por otro lado, la sobreexpresión de *ASE1* en dichas células no aliviaba este fallo en el ensamblaje del huso (Figura R26A). En cualquier caso, decidimos estudiar si la eliminación del SAC suprimía los defectos de segregación cromosómica en aquellas células que sobreexpresaban Ipl1 y Sli15 sin *MAD1* y que habían segregado correctamente los SPBs. Este análisis demostró que la eliminación del SAC no es capaz de suprimir los problemas de aneuploidías causados por el incremento de expresión de Ipl1 y Sli15 (Figura R26A), lo cual se ajusta a nuestros resultados previos. Así, de acuerdo a nuestra hipótesis, el incremento de actividad quinasa Ipl1 conduce a una desestabilización continua de las uniones microtúbulo-cinetocoro. Por tanto, no sería esperable que la delección del SAC suprimiese los problemas de segregación cromosómica en las células con niveles elevados de actividad quinasa Ipl1, ya que esto no evitaría que las conexiones de los cromosomas al huso continúen siendo eliminadas.

Resultados

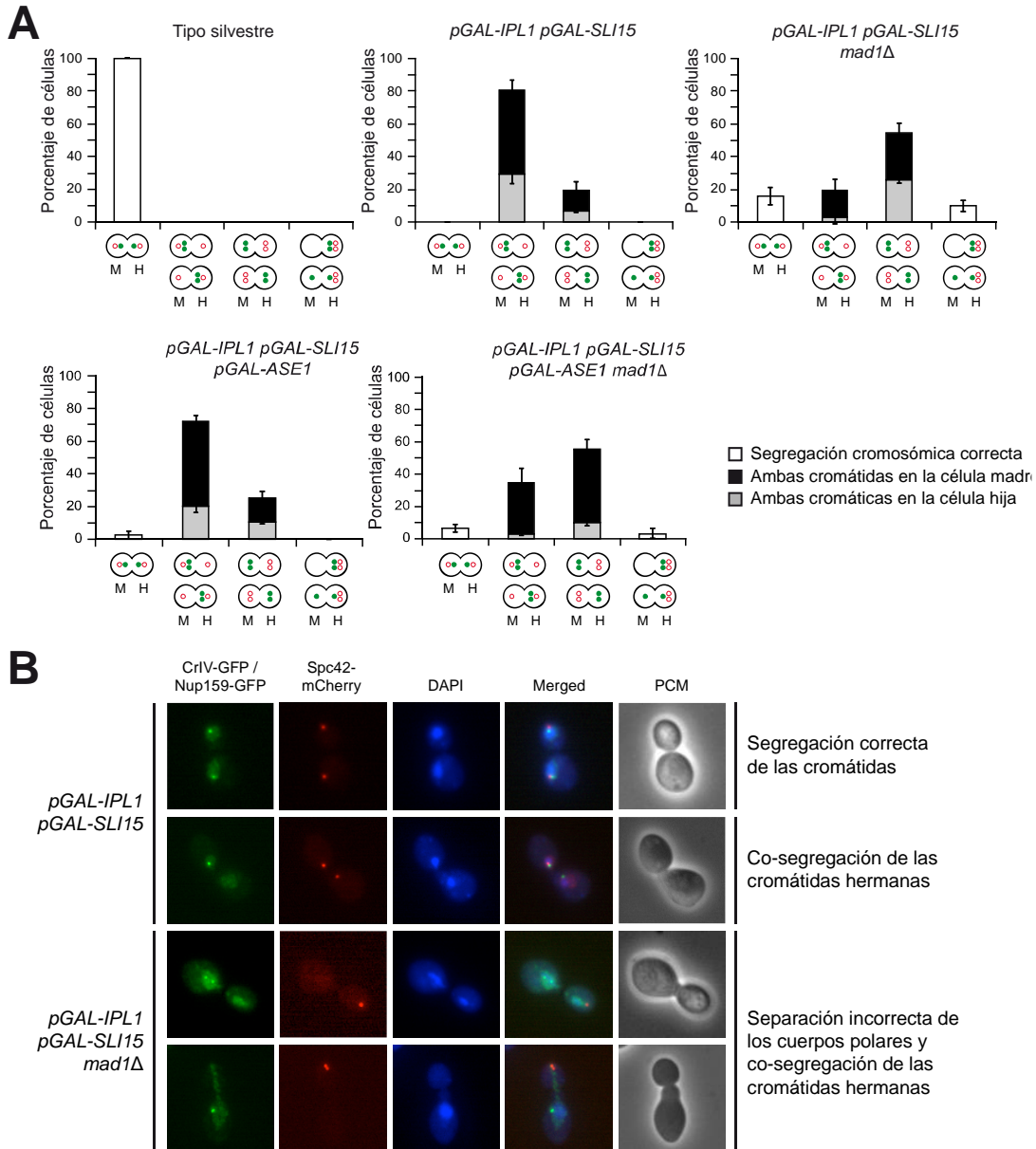


Figura R26. La delección de *MAD1* en las células que sobreexpresan *Ipl1* y *Sli15* provoca la cosegregación de los SPBs. (A) Células del tipo silvestre (F1483) y células de los mutantes *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15* (F1417) y *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15 mad1Δ* (F1927) con el CrIV-GFP y expresando Spc42-mCherry se sincronizaron en G1 haciendo uso de la feromona factor alfa (5 μ g/ml) y se liberaron en YPA-Raf/Gal (siguiendo el diseño experimental de la Figura R9A). Se muestra el análisis de la segregación cromosómica y de los SPBs. El gráfico de barras indica los diferentes patrones de segregación del CrIV-GFP (círculo verde cerrado) y Spc42-mCherry (círculo rojo abierto). Las barras de error indican la desviación estándar ($n = 3$). **(B)** Imágenes representativas de células *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15* (F1562) y células *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15 mad1Δ* (F1811) con el CrIV-GFP y expresando Nup159-GFP y Spc42-mCherry crecidas en YPA-Raf/Gal a 26°C. Para cada célula se muestra el cromosoma IV y la envoltura nuclear (CrIV-GFP y Nup159-GFP; verde), los SPBs (Spc42-mCherry; rojo) y el ADN (DAPI; azul), una imagen combinada del ADN, la membrana nuclear, los SPBs y el CrIV (Merged) y de PCM.

3.2.9 La inactivación del punto de control de ensamblaje del huso permite la citocinesis en células con niveles incrementados de Ipl1 y Sli15

La activación del SAC en células con niveles incrementados de Ipl1 y Sli15 podría explicar que estas células no consigan salir de mitosis y que, por tanto, no realicen citocinesis, ya que, una vez activo, el SAC conduce a un bloqueo del ciclo celular. De acuerdo con esto, en condiciones de inducción del promotor *pGAL* las células *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15 mad1Δ* realizaban la citocinesis y se acumulaban como células sin gemar, observándose un septo cerrado en el plano de división antes de la separación de las células madre e hija (Figura R27A y R27B).

La ruta NoCut inhibe la abscisión para prevenir que la maquinaria de citocinesis dañe el ADN cuando el huso se desensambla prematuramente y los cromosomas no han segregado de forma correcta, e Ipl1 desempeña un papel fundamental en ese punto de control (213, 215). El NoCut es funcional en mutantes del SAC (213), lo que sugiere que la sobreexpresión de Ipl1 y Sli15 no impide la citocinesis mediante la hiperactivación del NoCut, ya que la delección de *MAD1* permitía salir del ciclo a las células con actividad quinasa Ipl1 elevada. En cualquier caso, decidimos comprobar la funcionalidad del punto de control de la abscisión en las células *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15* en condiciones de sobreexpresión. Puesto que la ruta NoCut se activa en respuesta a defectos en la zona media del huso, y la delección de *ASE1* retrasa la abscisión mediante la activación de dicha ruta (213), evaluamos si la sobreexpresión de Ase1, y la consecuente estabilización del huso, en las células con incremento de actividad quinasa Ipl1 permitía la citocinesis. Las células con niveles incrementados de Ipl1, Sli15 y Ase1, sin embargo, no salían del ciclo, acumulándose como células con gema grande, al igual que lo observado para el mutante *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15* en condiciones de sobreexpresión (Figura R27A). Ahora bien, y apoyando de nuevo que la ausencia de citocinesis está asociada a la activación del SAC y no del NoCut, la delección de *MAD1* en células con niveles incrementados de Ipl1, Sli15 y Ase1 posibilitaba la salida del ciclo celular y la realización de la citocinesis (Figura R27A). Finalmente, y también de acuerdo a una

Resultados

ausencia de activación del NoCut, la delección de *AHC1*, que codifica el elemento de andamiaje de la acetiltransferasa de histonas ADA (un componente fundamental del NoCut (214, 215)), no promovía la citocinesis en células *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15*, y las células *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15 ahc1Δ* se acumulaban como células con gema grande y con un septo abierto en condiciones de inducción del promotor *pGAL* (Figura R27B y R27C). En resumen, nuestros resultados demuestran que las células con actividad quinasa Ipl1 incrementada no realizan citocinesis debido al bloqueo del ciclo producido por la hiperactivación del SAC, y no a una inhibición de la abscisión dependiente de la ruta NoCut.

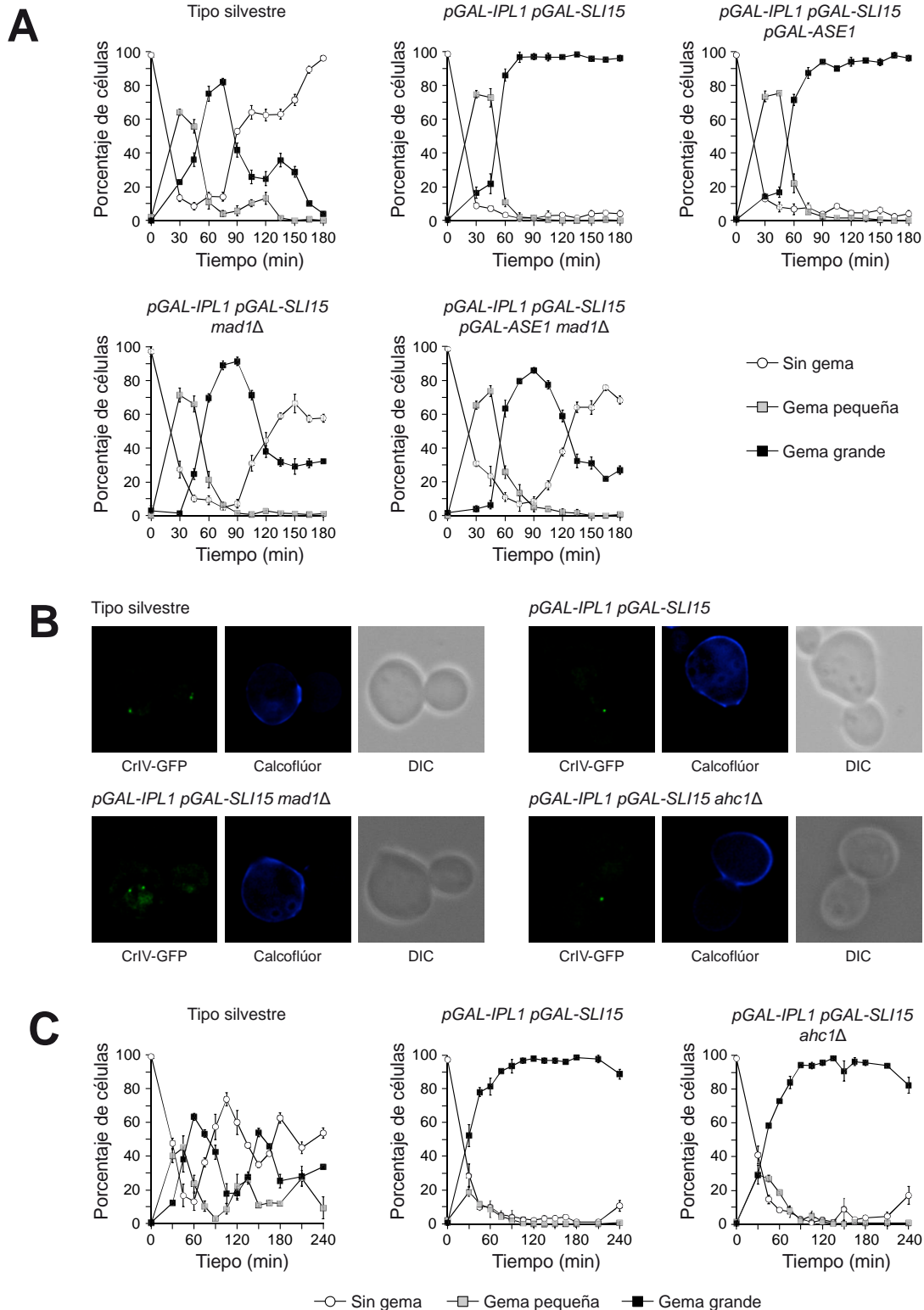


Figura R27. La falta de citocinesis está asociada a la activación del SAC y no de la ruta NoCut. Células del tipo silvestre (F1483 en (A) y F955 en (B) y (C)) y células de los mutantes *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15* (F1417 en (A) y F947 en (B) y (C)), *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15 ahc1Δ* (F1700), *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15 pGAL-ASE1* (F1908), *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15 mad1Δ* (F1927 en (A) y F1845 en (B)) y

Resultados

pGAL-IPL1 pGAL-SLI15 pGAL-ASE1 mad1Δ (F1910) se sincronizaron en G1 haciendo uso de la feromona factor alfa y se liberaron en YPA-Raf/Gal siguiendo el diseño experimental descrito en la Figura R9A. En el caso del experimento (C) no se reañadió factor alfa para impedir la entrada en un nuevo ciclo de gemación y las células fueron tratadas con liticasa previamente a su visualización al microscopio. **(A y C)** Se muestran los porcentajes de células sin gema, con gema pequeña y gema grande en los tiempos indicados tras la liberación del bloqueo en G1. Las barras de error indican la desviación estándar (n = 3). **(B)** Imágenes representativas en las que se muestran el CrIV (CrIV-GFP; verde), la pared celular (Calcoflúor; azul) y una imagen de DIC.

3.2.10 El incremento de expresión del homólogo humano Aurora B en levaduras conduce a letalidad celular

Hemos demostrado que en *S. cerevisiae* es necesaria la sobreexpresión conjunta de *IPL1* y *SLI15* para incrementar la actividad quinasa de Ipl1. Sin embargo, el aumento de expresión de Aurora B en células humanas es suficiente para conseguir niveles incrementados en su actividad quinasa (262). En base a esto, decidimos evaluar si la sobreexpresión individual del homólogo humano de Aurora B en *S. cerevisiae* hacía también posible en este organismo un incremento de la actividad quinasa que recapitulase los fenotipos observados para las células *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15* en condiciones de sobreexpresión. Con este objetivo, se clonó el ADNc de Aurora B (*AURK-B*) bajo el control del promotor *pGAL*, y se integró la construcción en el genoma de la levadura. Las células que sobreexpresaban *AURK-B* eran totalmente inviables, al igual que las células que sobreexpresaban Ipl1 y Sli15 (Figura R28A). Sin embargo, y a pesar de que la serina 10 de la histona H3 es una diana tanto de Ipl1 como de Aurora B, la sobreexpresión de *AURK-B* en *S. cerevisiae* no incrementaba los niveles de fosforilación de dicho residuo histónico (Figura R28B). Este resultado sugiere que la letalidad asociada a la sobreexpresión de *AURK-B* en levaduras de gemación no era debida a un aumento en su actividad quinasa. De acuerdo también con esto, y a diferencia de las células que sobreexpresaban Ipl1 y Sli15, las células que sobreexpresaban *AURK-B* realizaban citocinesis y salían del ciclo (Figura R28C). Finalmente, y aunque las células *pGAL-AURKB* mostraban problemas de segregación cromosómica en condiciones de inducción del promotor *pGAL* (Figura R28D), el patrón de segregación obtenido era

parecido al observado para el caso de células con actividad Ipl1 reducida (70). De este modo, aproximadamente la mitad de la población segregaba de manera incorrecta los cromosomas, mostrando un ligero sesgo en la cosegregación de las cromátidas hermanas hacia la célula hija (Figura R28D). Por tanto, los fenotipos asociados a la sobreexpresión de *AURK-B* eran similares a los observados tras el incremento de expresión del alelo sin actividad quinasa *ipl1-D227A*, lo que sugiere que la sobreexpresión de Aurora B se comporta de un modo dominante negativo en *S. cerevisiae*.

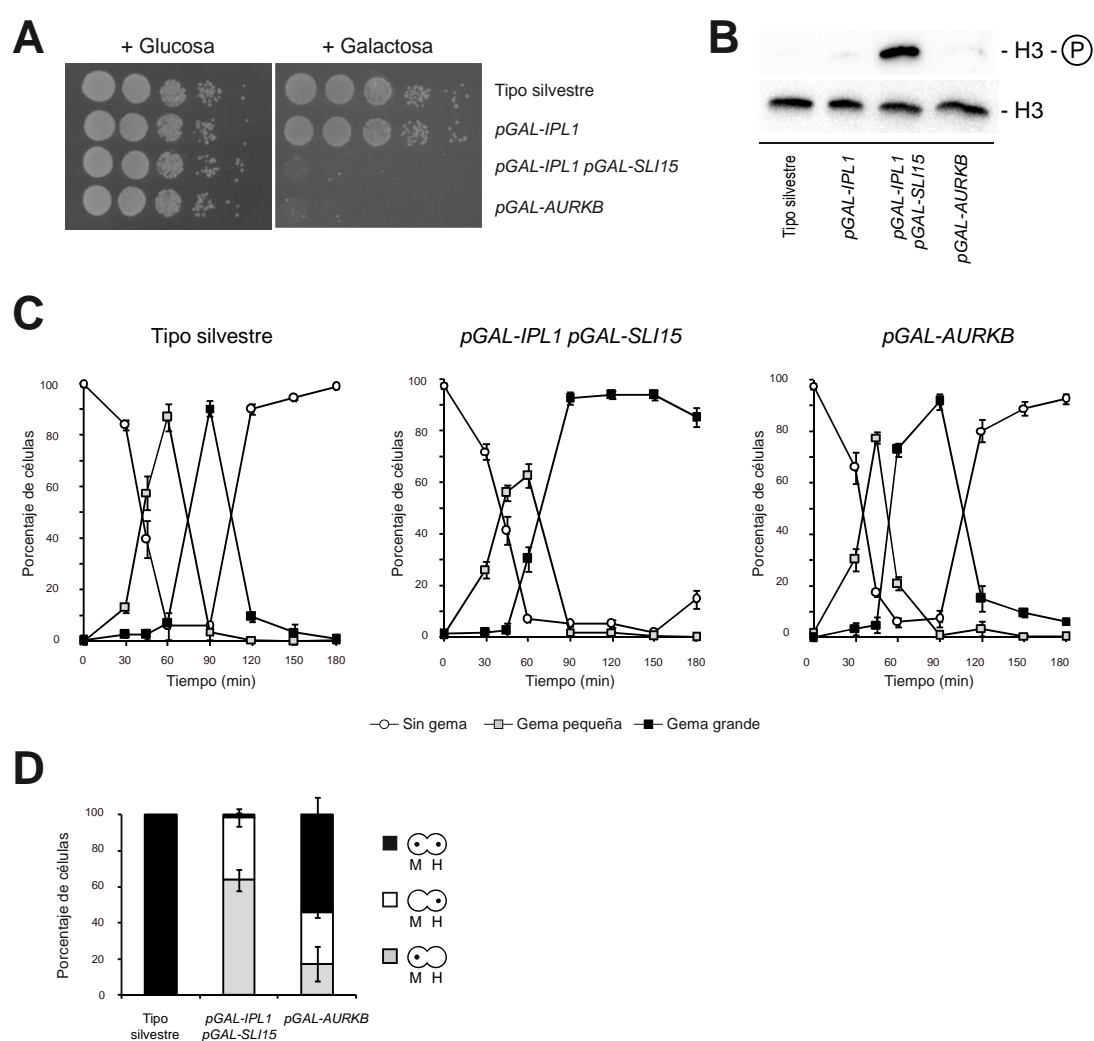


Figura R28. La sobreexpresión de Aurora B en *Saccharomyces cerevisiae* provoca letalidad celular y se comporta como un dominante negativo. (A y B) Células del tipo silvestre (F955) y células de los mutantes *pGAL-IPL1* (F256), *pGAL-IPL1 pGAL-SLI15* (F947) y *pGAL-AURKB* (F2242) se

Resultados

crecieron en YPA-Raf a 26°C. **(A)** Análisis de viabilidad mediante test de diluciones seriadas en placas de YPAD e YPA-Raf/Gal incubadas a 26°C. **(B)** Análisis Western de los niveles de H3 total y H3 fosforilada en la Serina 10 (H3- P) en muestras tomadas 60 minutos después de la inducción del promotor *pGAL*. **(C y D)** Células del tipo silvestre (F955) y de los mutantes *pGAL-IPL1* *pGAL-SLI15* (F947) y *pGAL-AURKB* (F2242) con el CrIV-GFP se sincronizaron en G1 con la feromona factor alfa (5 $\mu\text{g/ml}$) y se liberaron en YPA-Raf/Gal siguiendo el diseño experimental descrito en la Figura R9A. **(C)** Análisis de la progresión del ciclo celular mediante el estudio de la gemación. Se muestran los porcentajes de células sin gema, con gema pequeña o gema grande en cada tiempo tras la liberación del bloqueo en G1. Las barras de error muestran la desviación estándar ($n = 3$). **(D)** Análisis de la segregación del CrIV-GFP. Se muestran los porcentajes de células que han segregado correctamente las cromátidas hermanas o las han cosegregado bien hacia la célula madre (M) o bien hacia la hija (H). Las barras de error muestran la desviación estándar ($n = 3$).

3.3 Análisis del incremento de los niveles de expresión de Aurora quinasa B e INCENP en líneas celulares humanas

Durante el desarrollo de esta tesis hemos demostrado que en *S. cerevisiae* la sobreexpresión conjunta de la quinasa Ipl1 y su regulador Sli15 provoca graves defectos en la viabilidad celular. Si bien, como hemos indicado con anterioridad, la sobreexpresión de Aurora B en células humanas ya determina problemas de inestabilidad genética, existen estudios que demuestran los niveles de INCENP también se ven simultáneamente incrementados en algunos tumores, como en el caso de los tumores colorrectales (269). Es interesante, por tanto, estudiar el efecto del incremento de expresión conjunto de los homólogos humanos Aurora B e INCENP en líneas celulares humanas.

3.3.1 La expresión incrementada de Aurora B e INCENP provoca un incremento sinérgico de la actividad quinasa de Aurora B

Con objeto de evaluar los efectos de la expresión incrementada de *AURK-B* e *INCENP* en líneas celulares humanas, utilizamos plásmidos lentivirales en los que se clonaron los ADNc de ambos genes bajo el control de un promotor constitutivo de expresión elevada. En concreto, hicimos uso del plásmido pSIN-DUAL-GFP (288), que no posee marcador de selección con resistencia a droga, pero que permite la expresión constitutiva de GFP, de forma que se pueden distinguir las células que han incorporado el plásmido utilizando su fluorescencia como marcador. La transfección en células de la línea celular 293T de los plásmidos generados permitía el incremento en los niveles de expresión de Aurora B e INCENP (Figura R29).

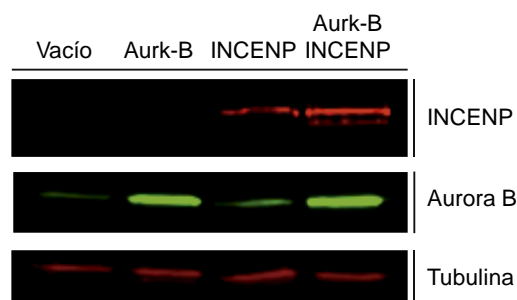


Figura R29. Sobreexpresión de Aurora B e INCENP en células 293T. Análisis Western de los niveles de Aurora B e INCENP en células 293T transfectadas con 1 μ g de plásmido pSIN-DUAL-GFP (Vacío), 1 μ g de pSIN-DUAL-GFP-Aurora B (Aurk-B), 1 μ g de pSIN-DUAL-GFP-INCENP (INCENP) y 1 μ g de los plásmidos pSIN-DUAL-GFP-Aurora B y pSIN-DUAL-GFP-INCENP (Aurk-B INCENP). Las proteínas se extrajeron pasadas 72 horas de la transfección. Los niveles de tubulina se usaron como control de carga.

La transfección con los plásmidos pSIN-DUAL-GFP es transitoria, puesto que, al no conferir resistencia a antibiótico, no podemos seleccionar la población transfectada. Por este motivo, y para asegurarnos de que la mayoría de las células haya incorporado los plásmidos usados en cada caso, decidimos alternativamente infectar las células con partículas lentivirales generadas con los plásmidos pSIN-DUAL-GFP, pSIN-DUAL-GFP-Aurora B y pSIN-DUAL-GFP-INCENP. De esta forma, seleccionando la multiplicidad de infección (MOI), y una vez titulados los virus obtenidos, se puede controlar el número de partículas virales añadidas por célula e igualar la carga viral entre condiciones. Por otra parte, debido a la inestabilidad genómica de la línea celular 293T y a la complejidad de su cariotipo, decidimos usar en su lugar la línea celular RPE1, que presenta un cariotipo estable. Tras la infección de células RPE1 con los lentivirus generados, el análisis de los niveles de expresión de Aurora B e INCENP mediante ensayos Western demostraba que tanto los niveles de Aurora B como los de INCENP se elevaban con respecto al control en las células infectadas (Figura R30). Los niveles de Aurora B eran similares cuando se sobreexpresaba de manera individual o conjuntamente con INCENP (Figura R30). Sin embargo, y de forma interesante, los niveles de proteína de INCENP eran superiores cuando se sobreexpresaba de forma simultánea con Aurora B que

cuando se sobreexpresaba individualmente (Figura R30). Estos resultados sugieren que el aumento de los niveles de Aurora B podría incrementar la estabilidad de INCENP. Adicionalmente, hay que resaltar también que en el caso de INCENP podían observarse en el gel varias formas de la proteína con diferente movilidad electroforética, que podrían reflejar cambios en su regulación post-traducciona (como fosforilación o degradación por caspasas), como se ha descrito previamente (289-291).

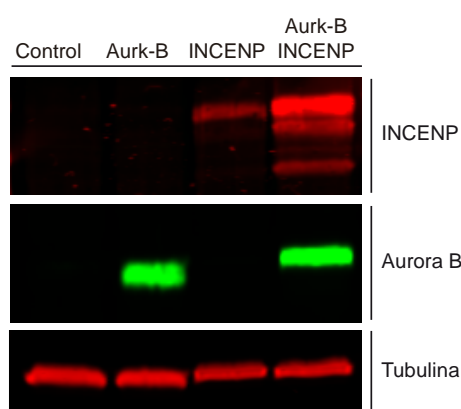


Figura R30. La sobreexpresión conjunta de Aurora B e INCENP incrementa la estabilidad de la subunidad reguladora. Análisis Western de los niveles de Aurora B e INCENP pasadas 72 horas de la infección. Se usaron para el estudio 100000 células RPE1 por cada condición. Control: infectadas con los virus del plásmido vacío (MOI = 4). Aurk-B: infectadas simultáneamente con los virus del plásmido vacío (MOI = 2) y con los virus de Aurora B (MOI = 2). INCENP: infectadas simultáneamente con los virus del plásmido vacío (MOI = 2) y con los virus de INCENP (MOI = 2). Aurk-B + INCENP: infectadas simultáneamente con los virus de Aurora B (MOI = 2) y con los virus de INCENP (MOI = 2). Los niveles de tubulina se usaron como control de carga.

Una vez establecido que nuestro sistema experimental permitía el incremento simultáneo de expresión de Aurora B e INCENP, comprobamos si esta sobreexpresión se correlacionaba con un aumento de la actividad quinasas de Aurora B. Con este objetivo, estudiamos los niveles de fosforilación de la serina 10 de la histona H3. Remarcablemente, y al igual que lo observado en *S. cerevisiae*, la

Resultados

sobreexpresión conjunta de Aurora B e INCENP provocaba un aumento exacerbado y sinérgico de la actividad quinasa (Figura R31).

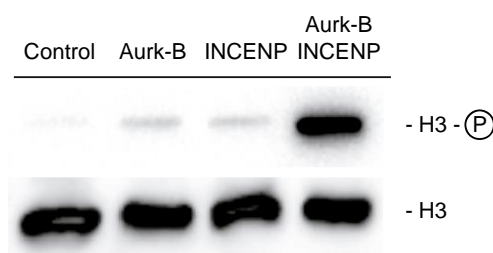


Figura R31. La sobreexpresión conjunta de Aurora B e INCENP supone un aumento sinérgico de la actividad quinasa. Análisis Western de los niveles de H3 total y H3 fosforilada en la serina 10 (H3- P) pasadas 72 horas de la infección. Para el estudio se usaron 100000 células RPE1 por cada condición. Control: infectadas con los virus del plásmido vacío (MOI = 4). Aurk-B: infectadas simultáneamente con los virus del plásmido vacío (MOI = 2) y con los virus de Aurora B (MOI = 2). INCENP: infectadas simultáneamente con los virus del plásmido vacío (MOI = 2) y con los virus de INCENP (MOI = 2). Aurk-B + INCENP: infectadas simultáneamente con los virus de Aurora B (MOI = 2) y con los virus de INCENP (MOI = 2).

3.3.2 La sobreexpresión conjunta de Aurora B e INCENP en líneas celulares humanas provoca letalidad celular pero no un bloqueo mitótico

El incremento simultáneo de los niveles de expresión de Ipl1 y Sli15 en células de *S. cerevisiae* afecta a la viabilidad celular. De este modo, a continuación decidimos comprobar si la sobreexpresión conjunta de Aurora B e INCENP se correlacionaba también con una pérdida de viabilidad en células humanas. Pasadas 48 horas de la infección, las células que sobreexpresaban tanto Aurora B como INCENP mostraban una tasa de crecimiento más alta que las células control y que las que sólo sobreexpresaban uno de los dos genes. Sin embargo, y de manera sorprendente, al reseñar las células pasado este tiempo, se observaba una pérdida dramática de la viabilidad para aquellas que poseían una expresión incrementada de Aurora B e INCENP (Figura R32).

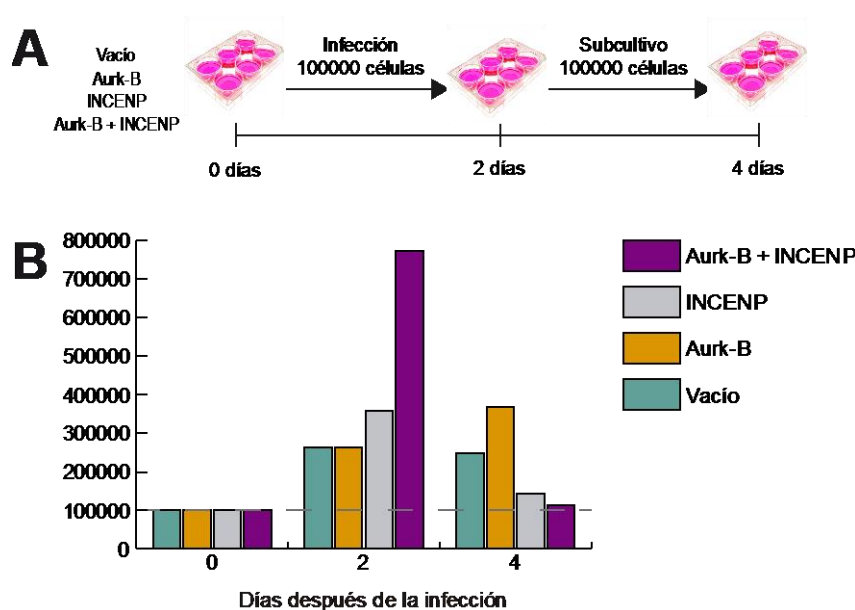


Figura R32. La sobreexpresión conjunta de Aurora B e INCENP conduce a letalidad celular. Para el estudio se usaron 100000 células RPE1 por cada condición. Control: infectadas con los virus del plásmido vacío (MOI = 4). Aurk-B: infectadas simultáneamente con los virus del plásmido vacío (MOI = 2) y con los virus de Aurora B (MOI = 2). INCENP: infectadas simultáneamente con los virus del plásmido vacío (MOI = 2) y con los virus de INCENP (MOI = 2). Aurk-B + INCENP: infectadas simultáneamente con los virus de Aurora B (MOI = 2) y con los virus de INCENP (MOI = 2). **(A)** Diseño experimental. **(B)** Análisis de viabilidad celular. Se muestra el número de células por cada condición en los días indicados después de la infección.

En *S. cerevisiae*, la sobreexpresión de Ipl1 y Sli15 determina un bloqueo en la transición metafase-anafase, con la consecuente estabilización de los niveles de Clb2. En base a esto, decidimos evaluar si, de forma similar, el aumento conjunto de Aurora B e INCENP en líneas celulares humanas tenía algún efecto sobre la progresión del ciclo celular. Sorprendentemente, y a pesar de lo observado previamente respecto a la viabilidad celular, el análisis del contenido genético llevado a cabo mediante citometría de flujo mostraba un perfil similar en las células que sobreexpresaban Aurora B y/o INCENP y las células control (Figura R33A). Además, los niveles de Ciclina B1 (homólogo funcional de Clb2) eran similares en las células con niveles incrementados de Aurora B y/o INCENP y las células control (Figura R33B). Estos resultados sugieren que, al contrario de lo observado en *S. cerevisiae* tras la sobreexpresión de Ipl1 y Sli15, el incremento de

Resultados

expresión de Aurora B e INCENP no conduce a un bloqueo de la mitosis en líneas celulares humanas.

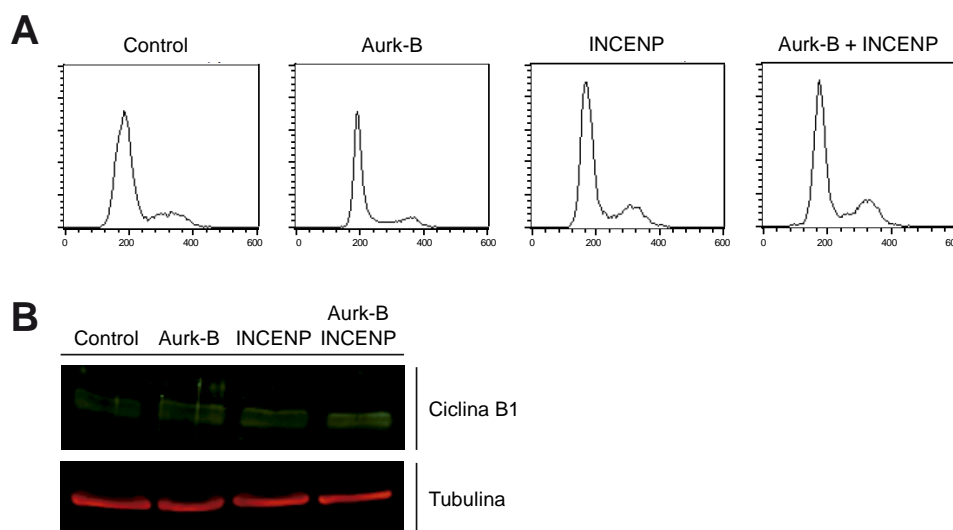


Figura R33. El incremento de expresión de Aurora B e INCENP no provoca un bloqueo en mitosis. Para el estudio se usaron 100000 células RPE1 por cada condición. Control: infectadas con los virus del plásmido vacío (MOI = 4). Aurk-B: infectadas simultáneamente con los virus del plásmido vacío (MOI = 2) y con los virus de Aurora B (MOI = 2). INCENP: infectadas simultáneamente con los virus del plásmido vacío (MOI = 2) y con los virus de INCENP (MOI = 2). Aurk-B + INCENP: infectadas simultáneamente con los virus de Aurora B (MOI = 2) y con los virus de INCENP (MOI = 2). **(A)** Análisis del contenido genómico mediante citometría de flujo pasadas 72 horas de la infección. **(B)** Análisis Western de los niveles de Ciclina B1 pasadas 72 horas de la infección. Los niveles de tubulina se usaron como control de carga.

3.3.3 El incremento simultáneo de la expresión de Aurora B e INCENP causa inestabilidad genómica

El descenso de viabilidad provocado por el incremento de expresión de Aurora B e INCENP de forma conjunta podría reflejar un aumento de la inestabilidad genómica. Una medida de dicha inestabilidad es el análisis del porcentaje de células con micronúcleos, que son cuerpos extranucleares originados por fragmentos cromosómicos acéntricos o cromosomas completos que se han

quedado detrás en anafase y no se han incluido en el núcleo principal durante telofase (292). Los fragmentos de cromosomas acéntricos se generan usualmente después de daños graves en el ADN, mientras que los micronúcleos que contienen cromosomas enteros son formados a causa de deficiencias en la segregación cromosómica (292). En el caso del control, y de acuerdo a los datos obtenidos mediante citometría de flujo, se observaban células con morfologías típicas de las distintas fases del ciclo celular (Figura R34) y un porcentaje bajo de células con micronúcleos, que permanecía constante en los tiempos analizados después de la infección (Figura R35A). Si bien la sobreexpresión de Aurora B o INCENP de forma individual aumentaba la presencia de micronúcleos, lo hacía sólo levemente respecto al control (Figura R35A). Sin embargo, el incremento simultáneo de los niveles de expresión de Aurora B e INCENP provocaba un aumento sinérgico del porcentaje de células con micronúcleos 144 horas después de la infección (Figura R35A). Estos resultados demuestran que la sobreexpresión de Aurora B e INCENP de manera simultánea conduce a una elevada tasa de inestabilidad genómica. Además, las células que sobreexpresaban Aurora B e INCENP mostraban morfologías nucleares aberrantes, así como “*lagging chromosomes*” (Figura R35). El porcentaje de células que presentaban formas nucleares asociadas a inestabilidad genómica (micronúcleos y morfologías aberrantes) incrementaba con el tiempo de sobreexpresión de Aurora B e INCENP (Figura R35A).

Estos resultados demuestran que la elevación simultánea de los niveles de expresión de Aurora B e INCENP conduce a un aumento de inestabilidad genómica muy superior al de la sobreexpresión de ambos genes por separado.

Resultados

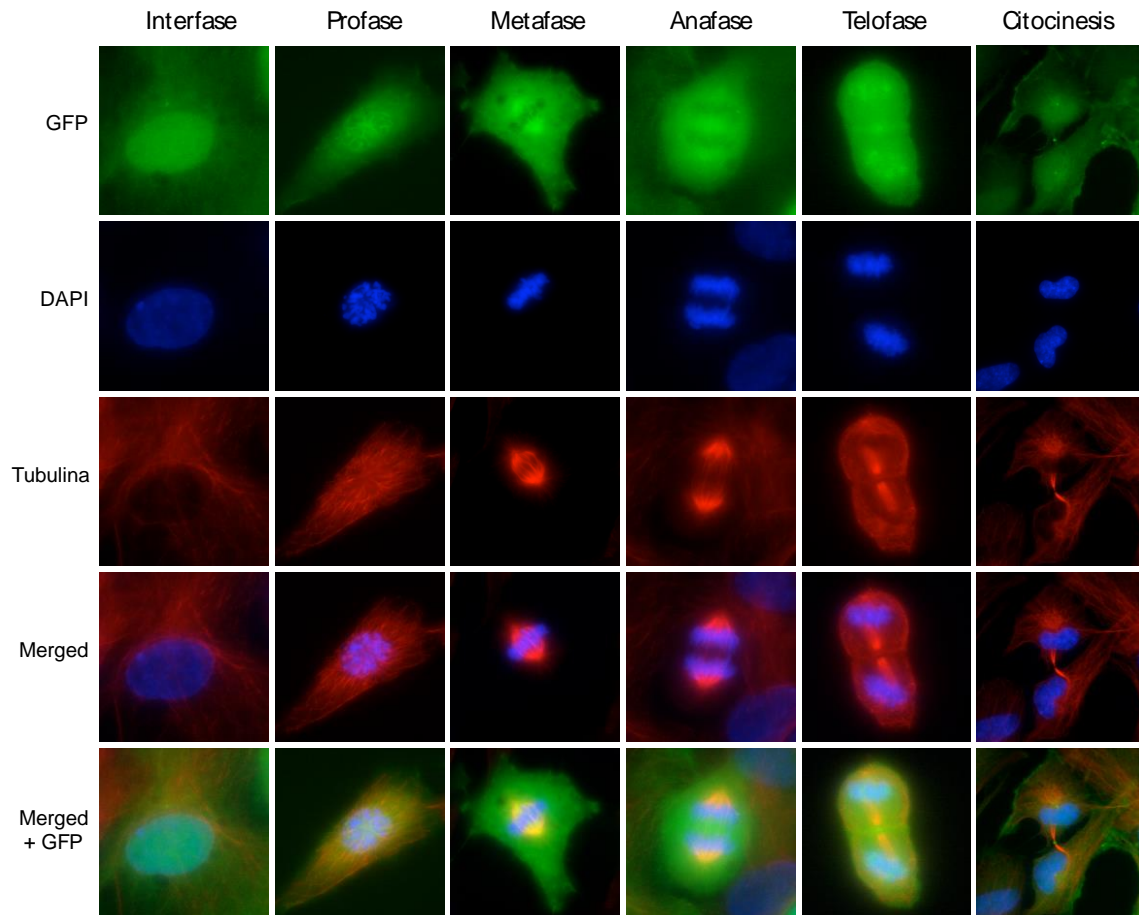


Figura R34. Análisis de la progresión del ciclo celular mediante la morfología del huso mitótico y del núcleo. Se muestran imágenes representativas de las distintas fases de mitosis de células RPE1 infectadas con los virus portadores del plásmido vacío (MOI = 4). Para cada célula se muestra la imagen correspondiente a GFP (células positivas para la infección; verde), el núcleo (DAPI; azul), el huso (Tubulina; rojo), una imagen combinada del huso y el núcleo (Merged) y una imagen combinada del huso, el núcleo y la señal de GFP (Merged + GFP).

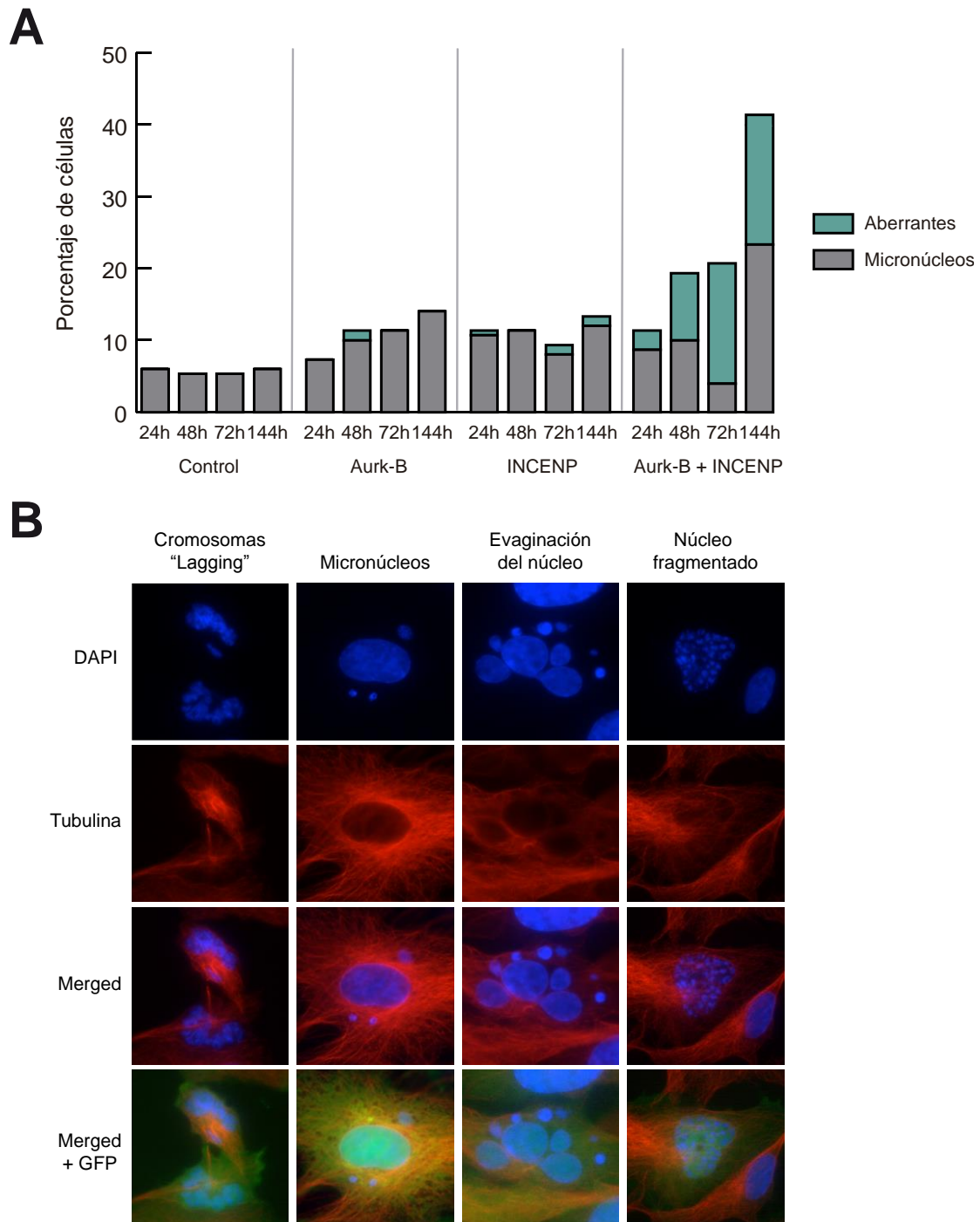


Figura R35. La sobreexpresión simultánea de Aurora B e INCENP causa inestabilidad genómica. Para el estudio se usaron 100000 células RPE1 por cada condición. Control: infectadas con los virus del plásmido vacío (MOI = 4). Aurk-B: infectadas simultáneamente con los virus del plásmido vacío (MOI = 2) y con los virus de Aurora B (MOI = 2). INCENP: infectadas simultáneamente con los virus del plásmido vacío (MOI = 2) y con los virus de INCENP (MOI = 2). Aurk-B + INCENP: infectadas simultáneamente con los virus de Aurora B (MOI = 2) y con los virus de INCENP (MOI = 2). **(A)** Porcentaje de células con micronúcleos y células con núcleos fragmentados en los tiempos indicados después de la infección. En la categoría de núcleos

aberrantes se incluyen células con más de tres micronúcleos y con el núcleo completamente fragmentado o evaginado. **(B)** Imágenes representativas de morfologías del núcleo observadas tras la sobreexpresión de Aurora B e INCENP. Para cada célula se muestra el huso (Tubulina; rojo), el núcleo (DAPI; azul), una imagen combinada del huso y del núcleo (Merged) y una imagen combinada del huso, el núcleo y la señal GFP, correspondiente a células infectadas (Merged + GFP).

3.3.4 La letalidad celular provocada por el incremento de expresión de Aurora B e INCENP no se asocia a un proceso de senescencia

La senescencia celular se considera un mecanismo supresor de tumores, ya que supone una parada irreversible del crecimiento que limita la proliferación celular excesiva o aberrante. La parada del crecimiento provocada por el proceso senescente se establece y se mantiene por las rutas supresoras de tumores gobernadas por p53 y p16-pRB (293, 294). Normalmente, las células senescentes se acumulan con un contenido genómico típico de fase G1, y sufren notables cambios morfológicos y en la expresión génica (293). Entre dichas alteraciones morfológicas se encuentran el aumento en el tamaño de la célula y el núcleo, la irregularidad de la envuelta nuclear, y la reorganización de la cromatina (293, 295). La superficie interna de la envuelta nuclear está delimitada por una lámina filamentosa, compuesta por las proteínas laminas A, B1, B2 y C, que contribuye al tamaño, forma y estabilidad del núcleo, así como al posicionamiento de la cromatina y la expresión génica (296-298). Recientemente se ha demostrado que los niveles de lamina B1, pero no el de las laminas B2, A y C, disminuyen precipitadamente cuando se induce senescencia por múltiples vías, pudiéndose emplear como un biomarcador general de senescencia (295).

Debido a la alta tasa de letalidad observada al sobreexpresar conjuntamente Aurora B e INCENP en la línea celular RPE1, así como a la aparición de núcleos con morfologías similares a los observados en las células senescentes, quisimos estudiar los niveles de lamina B1 en estas condiciones. El análisis de los niveles de lamina B1 y de lamina A/C demostraba que no existían diferencias entre las células control y las que sobreexpresaban Aurora B y/o INCENP (Figura R36A). Este

resultado, sumado al hecho de que no se observaba una acumulación de células en G1 mediante citometría de flujo, sugiere que el incremento de actividad quinasa Aurora B no desencadena una respuesta senescente.

3.3.5 La letalidad causada por el incremento de expresión simultáneo de Aurora B e INCENP se asocia posiblemente a un proceso apoptótico

La apoptosis es un proceso de muerte celular programada, responsable de la eliminación de forma controlada de células dañadas o no necesarias. Al igual que la mitosis, este tipo de muerte celular está altamente orquestada a nivel molecular por un conjunto específico de enzimas y sus reguladores. La apoptosis se caracteriza por una serie de cambios morfológicos y bioquímicos en las células, que incluyen, entre otros, disminución del tamaño celular, evaginación del núcleo, pérdida de adherencia de las células, condensación nuclear, fragmentación del ADN, externalización de la fosfatidilserina de la membrana plasmática y activación de las caspasas apoptóticas (299-303). A causa de la generación de fragmentos de ADN de tamaño molecular más bajo durante la apoptosis, las células apoptóticas pueden ser rápidamente identificadas mediante citometría de flujo como células con un contenido “sub-G1” o hipodiploide (303). De forma interesante, y de acuerdo a un incremento en los niveles de apoptosis, el análisis del contenido genómico mediante FACS mostraba un aumento en la proporción de células con un contenido genómico “sub-G1” en el caso de la sobreexpresión simultánea de Aurora B e INCENP en relación tanto a las células control como a las células que sobreexpresaban Aurora B o INCENP individualmente (Figura R36B).

En respuesta a estrés celular asociado a daños en el huso mitótico, daños en el ADN o desregulación del ciclo celular, entre otros, la proteína supresora de tumores p53 se estabiliza y se acumula rápidamente en el núcleo, donde funciona como factor de transcripción. La estabilización de p53 conduce a una parada del ciclo celular o apoptosis (304, 305). De acuerdo con esto, y con el aumento del porcentaje de

Resultados

células con un contenido genético hipodiploide, los niveles de p53 eran más elevados en el caso de las células con niveles de expresión incrementada de Aurora B e INCENP que los observados para las células control y aquellas que sólo sobreexpresaban Aurora B o INCENP (Figura R36C).

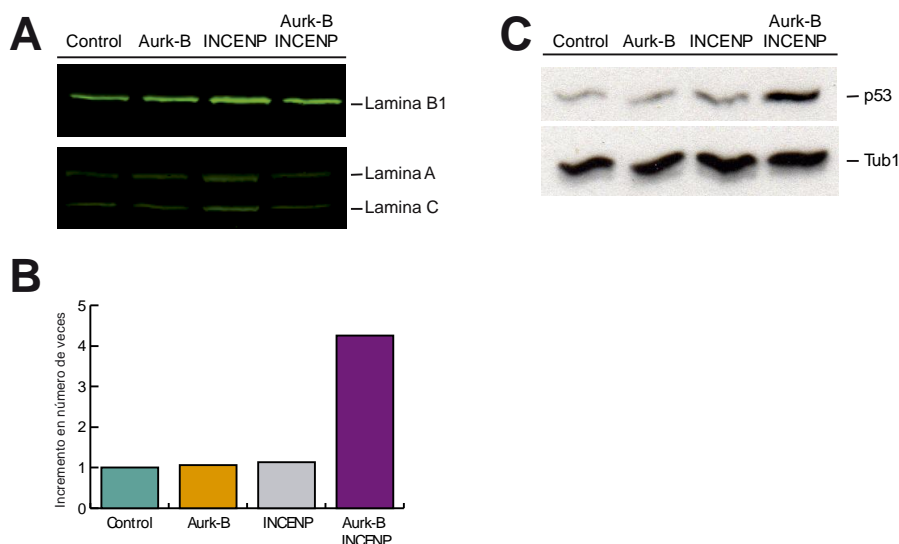


Figura R36. El incremento de expresión de Aurora B e INCENP se asocia posiblemente a un proceso de muerte celular programada. Para el estudio se usaron 100000 células RPE1 por cada condición. Control: infectadas con los virus del plásmido vacío (MOI = 4). Aurk-B: infectadas simultáneamente con los virus del plásmido vacío (MOI = 2) y con los virus de Aurora B (MOI = 2). INCENP: infectadas simultáneamente con los virus del plásmido vacío (MOI = 2) y con los virus de INCENP (MOI = 2). Aurk-B + INCENP: infectadas simultáneamente con los virus de Aurora B (MOI = 2) y con los virus de INCENP (MOI = 2). **(A)** Análisis Western de los niveles de Lamina B1 y Lamina A/C a las 72 horas de la infección. **(B)** Se representa el incremento en número de veces del porcentaje de células con un contenido genético hipodiploide obtenido mediante citometría de flujo a las 72 horas de la infección. **(C)** Análisis Western de los niveles de p53 pasadas 72 horas de la infección. Los niveles de tubulina se usaron como control de carga.

Nuestros resultados, por tanto, sugieren que el incremento de actividad quinasa Aurora B provocado por el aumento simultáneo de expresión de Aurora B e INCENP determina una alta tasa de inestabilidad genómica que, en última instancia, provoca la muerte celular debida, probablemente, a un proceso apoptótico.

4 Discusión

4.1 Reevaluación de la relación funcional entre Aurora B y el punto de control de ensamblaje del huso

La correcta distribución del material genético durante mitosis requiere que todos los cromosomas estén unidos a microtúbulos del huso. La existencia de un único cromosoma no unido activa el punto de control de ensamblaje del huso (SAC), que detiene la progresión del ciclo celular en metafase (31). Adicionalmente, las células deben también asegurarse de que todos los cromosomas estén bi-orientados, es decir, que cada una de las cromátidas hermanas de un cromosoma se una a un polo diferente del huso. La quinasa Aurora B, el componente enzimático del Complejo Pasajero del Cromosoma (CPC), es crucial en este proceso (19, 76). Así, se ha propuesto un modelo lineal en el que Aurora B y el SAC colaboran para lograr la correcta bi-orientación de los cromosomas durante mitosis (31). Según este modelo, Aurora B desestabiliza las uniones incorrectas que no conducen a tensión en el huso, generando cinetocoros vacíos susceptibles de activar el SAC. El SAC, a su vez, proporciona a la célula el tiempo que Aurora B necesita para corregir las uniones erróneas y lograr la bi-orientación de las cromátidas hermanas antes de progresar a anafase (19, 254). Recientemente, se ha sugerido que, además de la desestabilización de las uniones incorrectas de los cinetocoros al huso, la fosforilación de sustratos de Aurora B en el cinetocoro también es importante para prevenir el silenciamiento del SAC hasta que se ha conseguido establecer la bi-orientación cromosómica (306). Además, la relocalización del CPC desde los centrómeros a la zona media del huso en anafase se requiere para impedir la reactivación del SAC una vez que las cromátidas hermanas se separan y de nuevo se pierde la tensión (106, 107).

En base al mecanismo lineal para explicar la resolución de uniones microtúbulo-cinetocoro erróneas descrito anteriormente, y aceptado en la actualidad, sería

esperable que tanto una deficiencia en la actividad de Aurora B como en el SAC provocaran defectos similares de segregación cromosómica. Sin embargo, sorprendentemente, los fenotipos de mutantes en Aurora B y en el SAC son muy diferentes en términos de segregación de los cromosomas. En *S. cerevisiae*, esta diferencia es muy acusada, ya que en este organismo *IPL1* (el gen que codifica el homólogo de Aurora B) es un gen esencial, cuya inactivación conduce a graves problemas de aneuploidía (70), mientras que los mutantes en el SAC son perfectamente viables en condiciones normales de crecimiento y no muestran defectos evidentes durante la distribución del genoma en mitosis (255). En principio, esta discrepancia podría explicarse en base a dos hipótesis diferentes. Una posibilidad, sugerida previamente por otros autores, es que Ipl1 pueda detener el ciclo celular con independencia del SAC (256). Esto garantizaría la ventana temporal que la propia quinasa necesita para corregir las uniones microtúbulo-cinetocoro erróneas en ausencia de este punto de control. De manera interesante, en un estudio global de dobles híbridos se ha descrito una interacción entre Ipl1 y Apc1 (la subunidad principal del complejo APC/C) (257). Por otro lado, en células HeLa, se ha identificado una interacción *in vivo* de Aurora B tanto con Cdc27 (subunidad del APC/C) como con Cdc20, relacionándose dichas interacciones con el proceso de degradación de Aurora B mediado por APC/C y el proteasoma (162). Estos datos sugieren que Ipl1 podría inhibir directamente la actividad APC/C^{Cdc20} de manera independiente al SAC. Sin embargo, y a pesar de varios intentos por verificar una posible interacción física entre Ipl1 y componentes del APC/C o Cdc20 que apoye una regulación directa del APC/C y, por tanto, de la transición metafase-anafase por Aurora B, en nuestro laboratorio hemos sido incapaces de encontrar ninguna evidencia de asociación directa entre estas proteínas en *S. cerevisiae*.

Una hipótesis alternativa para explicar la discordancia planteada con anterioridad es que la eficiente resolución de las uniones microtúbulo-cinetocoro por Ipl1 durante las etapas iniciales del ensamblaje del huso pueda hacer al SAC dispensable durante el crecimiento normal de la célula. Los resultados detallados

en esta Tesis Doctoral están de acuerdo con esta hipótesis, y reconcilian el modelo aceptado actualmente para la resolución de uniones sintéticas a través de la acción combinada de Aurora B y el SAC con la diferencia de fenotipos asociados a la deficiencia en uno u otro componente de este sistema. De este modo, y en base a nuestros resultados, proponemos que la actividad eficiente de Ipl1, junto con la dinamicidad del proceso de unión de los cromosomas a los microtúbulos del huso, convierten al SAC en un mecanismo de salvaguardia que sólo se convierte en necesario en situaciones en las que se ve afectada la captura de los cinetocoros por los microtúbulos y es preciso detener el ciclo celular para garantizar la viabilidad. En línea con esta argumentación, hemos demostrado que la viabilidad de las células con actividad reducida de Ipl1 se ve comprometida en ausencia de un SAC funcional, y que la inactivación simultánea de Ipl1 y el SAC conduce a defectos sinérgicos de segregación cromosómica. Adicionalmente, hemos demostrado que el SAC se vuelve esencial cuando se retrasa el inicio de la actividad de Ipl1 y la quinasa no dispone del tiempo necesario para asegurar la bi-orientación cromosómica. En *S. cerevisiae*, la duplicación del cuerpo polar del huso (SPB) es conservativa, es decir, el SPB original permanece intacto durante su duplicación (6). Además, dicho SPB es heredado por la célula hija en el 98% de las ocasiones, y esta distribución asimétrica no se ve afectada por la disminución de actividad Ipl1 (70, 307). Por otra parte, los cinetocoros de ambas cromátidas hermanas están unidos en un primer momento al SPB original, ya que la duplicación de los cuerpos polares finaliza después de la duplicación del ADN (6). Esto hace especialmente necesario que las uniones microtúbulo-cinetocoro sean eficientemente eliminadas para lograr bi-orientar los cromosomas. En consonancia con estos datos, cuando se inhibe Ipl1 hasta metafase y las células se bloquean en esta etapa del ciclo celular, el huso se elonga de manera anormal debido a la acumulación de uniones sintéticas que no están siendo reparadas en ausencia de la quinasa. Nuestros resultados demuestran que la reactivación de la actividad quinasa de Ipl1 antes de liberar las células del bloqueo en metafase permite a las mismas detener la progresión del ciclo hasta que el huso recupera su morfología metafásica normal y los cromosomas se bi-orientan. Sin embargo, si la reactivación de Ipl1 ocurre en

ausencia del SAC, el huso no recupera la morfología normal de metafase, y las células progresan directamente a anafase con los cromosomas mono-orientados. Estos resultados no sólo apoyan nuestra hipótesis sino que, adicionalmente, están en contra de que Ipl1 promueva una posible parada del ciclo celular con independencia del SAC. Es importante señalar que nuestros datos no nos permiten descartar una posible interacción física entre Ipl1 y el APC/C o Cdc20 en células de levadura. De hecho, al igual que ocurre en células HeLa donde el incremento de expresión de Cdc20 o Cdh1 (otro cofactor del APC/C) disminuye la expresión de Aurora B (162), el aumento en la expresión de Cdc20 provoca un ligero descenso en los niveles de Ipl1 en *S. cerevisiae*. De este modo, de ocurrir, dicha interacción podría estar relacionada con el proceso de degradación de Ipl1 por el APC/C y el proteasoma, y no con una regulación directa del APC/C por parte de Ipl1. En conclusión, el conjunto de datos anteriores sugiere que Ipl1 es capaz de reparar las uniones sintéticas eficientemente en las etapas iniciales del ciclo, de forma que el establecimiento del huso mitótico bipolar tiene lugar antes de que las células estén preparadas para llevar a cabo la transición metafase-anafase.

Nuestras conclusiones, si bien obtenidas en *S. cerevisiae*, creemos que pueden ser extrapoladas para explicar la distinta dependencia de la funcionalidad del SAC que muestran células de organismos distintos, e incluso diferentes tipos celulares del mismo organismo, para garantizar la viabilidad celular. A diferencia de lo que ocurre en *S. cerevisiae*, el SAC sí es esencial para la viabilidad de *C. elegans*, *D. melanogaster* y células humanas y de ratón (308-311). No obstante, las células carentes de Aurora B y las células deficientes en el SAC también presentan fenotipos distintos en estos organismos. Así, en modelos de ratón, se ha descrito que tanto la inactivación simultánea de Aurora B y Aurora C (otro miembro de la familia Aurora quinasa que puede compensar parcialmente la falta de Aurora B durante embriogénesis) como las deleciones en homocigosis de INCENP, Survivina o Borealina (los tres componentes no-enzimáticos del CPC) conducen a letalidad embrionaria muy temprana (incluso en el estadio de dos células), con una elevada tasa de segregación cromosómica incorrecta y de inestabilidad genómica (312-

315). Sin embargo, y aunque la disrupción de *Mad2* en homocigosis también conduce a letalidad durante la embriogénesis del ratón, las células embrionarias carentes de un SAC funcional parecen crecer con normalidad hasta E5.5 (309). Además, la letalidad en estas células se asocia a un incremento en apoptosis, y los embriones de ratón nulos para *Mad2* y *p53* son viables en cultivo (316). Estos datos sugieren que las células embrionarias de ratón deficientes para el SAC mueren principalmente como consecuencia de la apoptosis (regulada al menos en parte por *p53*), más que por una catástrofe mitótica *per se*. La inactivación de *p53*, sin embargo, no suprime los defectos en proliferación celular y apoptosis debidos a la falta de actividad del CPC (315), sugiriendo que la inactivación del CPC afecta directamente a la mitosis y conlleva a una muerte por apoptosis a través de un mecanismo independiente de *p53*. De forma destacada, es sólo a partir del inicio de la gastrulación (E6.5) cuando el SAC se convierte en esencial durante la embriogénesis del ratón (309). Esta observación puede ser explicada fácilmente de acuerdo a nuestro modelo. La gastrulación es un período particularmente activo del desarrollo, durante el cual las células embrionarias se dividen más rápidamente (317). Obviamente, esto reduce el tiempo para la finalización de la mitosis durante la gastrulación, lo que, a su vez, disminuye el tiempo del que Aurora B dispone para reparar las uniones microtúbulo-cinetocoro y explica que, en consecuencia, el SAC se convierta en esencial.

Existen importantes diferencias con respecto al proceso de segregación cromosómica entre las células de levadura de gemación y las de eucariotas superiores. Así, mientras que los cromosomas de *S. cerevisiae* se unen a microtúbulos durante la mayoría del ciclo celular, los cromosomas de eucariotas superiores se unen a los microtúbulos que emanan de los polos del huso sólo durante mitosis (318). Adicionalmente, y mientras que en *S. cerevisiae* se une un único microtúbulo por cinetocoro, los cinetocoros de metazoos conectan simultáneamente con varios microtúbulos del huso (319). Por último, también debe considerarse que el número de cromosomas en las células varía enormemente entre los distintos organismos. Todos estos factores podrían explicar

las diferencias observadas en cuanto al distinto requerimiento del SAC que muestran las células de distintos organismos para su viabilidad. De esta forma, el inicio de la captura de los cinetocoros por los microtúbulos del huso en prometafase reduce el período de tiempo del que Aurora B dispone para llevar a cabo la corrección de las uniones incorrectas en eucariotas superiores, especialmente en el caso de células con un número elevado de cromosomas. Cuanto mayor es el número de cromosomas y de microtúbulos que se unen por cinetocoro, así como cuanto más tarde empieza la captura de los cinetocoros por parte del huso, más difícil es conseguir la bi-orientación cromosómica y, por tanto, mayor es la supeditación de las células a la funcionalidad del SAC para proporcionar a Aurora B el tiempo necesario para corregir las uniones erróneas. De acuerdo con esta idea, se ha demostrado que la deficiencia del SAC es incompatible con la supervivencia de las células madre del folículo capilar de ratón, mientras que la falta de este punto de control es tolerada en células de la epidermis interfolicular del mismo organismo (320). De forma destacada, en las células de la epidermis interfolicular de ratón, la duración de la prometafase es mayor que en las células del folículo capilar (320), lo cual proporciona a Aurora B más tiempo para asegurar la bi-orientación de los cromosomas.

En base a estos estudios, y a los datos obtenidos durante la realización de esta Tesis Doctoral, proponemos que es la ventana temporal requerida por la quinasa Aurora B para establecer la bi-orientación cromosómica la que determina la diferente dispensabilidad del SAC para garantizar la bi-orientación de los cromosomas durante un ciclo celular normal y, en consecuencia, también la viabilidad de las células.

4.2 Análisis de las consecuencias del incremento de actividad quinasa Aurora B en *Saccharomyces cerevisiae*

Aurora quinasa B es una proteína pasajera del cromosoma que posee un papel fundamental en el control del ciclo celular asegurando la correcta segregación de los cromosomas y la progresión normal de la mitosis (76). Los niveles de expresión de esta proteína presentan un máximo en fase G2-M, siendo su expresión mínima durante interfase (263, 321). Por otra parte, su actividad quinasa es máxima durante mitosis, alcanzándose un pico de actividad justo después de la inactivación de la quinasa CDK1 (321). Sin embargo, en varias líneas celulares cancerosas Aurora B está constantemente sobreexpresada a lo largo del ciclo celular (231). Se ha demostrado que la sobreexpresión de Aurora quinasa B conduce a multinuclearidad en las células y se ha sugerido que, posiblemente, determina inestabilidad genética a causa de los defectos que genera en la progresión mitótica (231). Además, las células tumorales que sobreexpresan Aurora B de manera estable muestran un crecimiento más agresivo que las células tumorales control (262). Esto sugiere que la sobreexpresión de Aurora B podría tener un papel importante durante el desarrollo del cáncer.

Se sabe que, en metazoos, la sobreexpresión de Aurora B determina inestabilidad cromosómica y problemas de segregación (262), activación del SAC (262) e imposibilidad de realizar la citocinesis (231, 263). No obstante, hasta el desarrollo de esta Tesis Doctoral se desconocían los mecanismos moleculares que determinan estos fenotipos y, por tanto, el posible mecanismo por el cual dicha sobreexpresión podría promover la tumorigénesis. La levadura *S. cerevisiae* es un organismo modelo ideal para el estudio del ciclo celular. Un cuerpo considerable de evidencias demuestra que la regulación del ciclo celular es remarcablemente similar en levaduras y humanos. Los avances en nuestro conocimiento sobre la regulación de la mitosis en levaduras tienen una importancia incuestionable, y han jugado un papel fundamental en la elucidación de los mecanismos que conducen al desarrollo del cáncer. No obstante, la sobreexpresión del homólogo de Aurora B en *S.*

cerevisiae (Ipl1) no presenta ningún fenotipo aparente ni conduce a letalidad celular (71). Este hecho ha contribuido a nuestro escaso conocimiento sobre las consecuencias moleculares del incremento de actividad Aurora quinasa B.

La actividad quinasa de Ipl1 está rigurosamente controlada, lo que puede explicar que un aumento en sus niveles de expresión no necesariamente implique un aumento en su actividad quinasa. Además, la localización y la actividad de Ipl1 dependen de los componentes no-enzimáticos del CPC (76). Entre las subunidades no-enzimáticas del CPC destaca Sli15, un componente esencial para el andamiaje del complejo, cuyos niveles también son estrictamente regulados (76, 322). En base a lo anterior, al inicio de esta Tesis Doctoral nos planteamos la posibilidad de que para lograr un aumento en la actividad quinasa en levaduras no sea suficiente con la sobreexpresión de Ipl1 exclusivamente, sino que quizás sea necesario el aumento adicional de la expresión de su subunidad reguladora Sli15. De acuerdo con esta hipótesis, cuando se sobreexpresa sólo Ipl1 su actividad quinasa no aumentaría debido a que, para que la proteína sea activa, esta debe interactuar con Sli15. Así, al no incrementarse también su nivel de expresión, Sli15 se comportaría como “sustrato limitante”. Esto justificaría que, como se ha descrito previamente (71), no observemos problemas de viabilidad y fenotipos aparentes debido a la sobreexpresión de Ipl1. Cuando son los niveles de Sli15 los que se incrementan, si bien tampoco se observa letalidad celular, en este caso se generan leves defectos sobre la viabilidad de las células. Esto sugiere que los niveles de Sli15 son más limitantes en el interior celular que los de Ipl1, de forma que un incremento de la expresión de Sli15 favorece la formación del CPC y reduce la cantidad de Ipl1 que no está formando parte de este complejo, lo que determina una mayor proporción de quinasa activa y correctamente localizada.

Para verificar nuestra hipótesis inicial, decidimos por tanto estudiar los efectos del aumento simultáneo de la expresión de *IPL1* y *SLI15*. Nuestros resultados demuestran que, de acuerdo a esta predicción, la sobreexpresión conjunta de Ipl1 y Sli15 conduce a una elevada actividad quinasa de Ipl1, que se refleja en una

hiperfosforilación de la serina 10 de la histona H3. Las células con actividad quinasa Ipl1 incrementada manifiestan graves problemas de viabilidad celular. Además, la elevación de los niveles de expresión de Ipl1 y Sli15 provoca defectos de segregación cromosómica, activación del SAC, inestabilidad del huso mitótico y ausencia de citocinesis, fenotipos que se asemejan a los causados por el incremento de actividad quinasa Aurora B en metazoos.

Nuestro modelo de sobreexpresión de la actividad quinasa Aurora B en *S. cerevisiae*, nos ha facilitado la disección molecular de los mecanismos moleculares que subyacen a los defectos asociados a dicho incremento. Para descifrar estos mecanismos, una de nuestras primeras aproximaciones experimentales ha sido intentar revertir los efectos del aumento de actividad Ipl1. Así, por ejemplo, probamos la reversión de los defectos asociados a la sobreexpresión de Ipl1 y Sli15 incrementando también la expresión de la fosfatasa que contrarresta la actividad quinasa de Ipl1. PP1 se considera la principal fosfatasa que antagoniza a Aurora B, tanto en *S. cerevisiae* como en metazoos (276, 323). En levaduras de gemación, PP1 está codificada por *GLC7*, y se ha demostrado que la disminución en su actividad fosfatasa suprime los fenotipos asociados a la disminución de actividad quinasa Ipl1, mientras que su sobreexpresión conduce a fallos en la segregación de los cromosomas (324, 325). La sobreexpresión de Glc7, sin embargo, no recupera la letalidad causada por el incremento de actividad quinasa de Ipl1, y las células siguen presentando graves problemas de segregación. Puesto que el aumento de expresión de Glc7 por sí solo conduce a letalidad celular y aneuploidía, y los detalles moleculares subyacentes a esta pérdida de viabilidad no están bien definidos (47, 277, 326), es difícil determinar los mecanismos que conllevan a letalidad en las células que sobreexpresan conjuntamente Ipl1, Sli15 y Glc7. No obstante, y en relación a estos resultados, cabe destacar que, mientras que hemos encontrado que existen células capaces de revertir de forma espontánea la letalidad celular causada por el incremento de expresión de Ipl1 y Sli15, no se observan células que puedan recuperar la viabilidad en el caso de la sobreexpresión conjunta de Ipl1, Sli15 y Glc7. Estos datos sugieren que el

incremento en los niveles de expresión de Ipl1, Sli15 y Glc7 provoca en la célula una acumulación de daños mayor que en el caso de la sobreexpresión conjunta de Ipl1 y Sli15. En humanos, la desregulación de PP1 se ha asociado a numerosas enfermedades, como es el caso del cáncer (327-337), y, en la actualidad, esta proteína está recobrando relevancia como diana farmacéutica (338). Sin embargo, debido a que la actividad fosfatasa PP1 controla varias rutas importantes para el crecimiento y la proliferación celular (339-342), es difícil averiguar los sustratos exactos que en un estado de fosforilación anormal conducen a la progresión tumoral. De forma interesante, algunos tipos de cáncer responden a activadores de la actividad fosfatasa y otros, sin embargo, a inhibidores (338). Según nuestros resultados, la hiperactivación de Glc7 inhibe la capacidad de recuperar la viabilidad de las células con incremento de actividad quinasa Ipl1. Extrapolando estos resultados obtenidos en *S. cerevisiae* a células humanas, quizás la potenciación de la actividad de PP1 podría suponer un freno para el crecimiento celular y el proceso tumoral en células que muestran una expresión incrementada de Aurora B.

En cultivos celulares, se ha demostrado que la elevación de la actividad Aurora quinasa B provoca inestabilidad en el número de cromosomas, asociada al incremento en la fosforilación de la serina 10 de la histona H3 (262). Es posible pensar, por tanto, que en *S. cerevisiae* la hiperfosforilación de este residuo histónico debida a la sobreexpresión de Ipl1 y Sli15 pudiese estar relacionada con la pérdida de viabilidad y los defectos de segregación cromosómica. Sin embargo, la introducción del alelo fosfomutante de la serina 10 de la histona H3 (H3S10A) no alivia los fenotipos asociados al incremento de actividad quinasa Ipl1. Este resultado está de acuerdo con estudios genéticos previos en levaduras, que demuestran que la estirpe fosfomutante para la serina 10 de la histona H3 muestra tiempos de generación y una progresión a lo largo del ciclo indistinguible a los del tipo silvestre (150), sugiriendo que en *S. cerevisiae* dicha marca histónica no es esencial para la estructura y segregación de los cromosomas.

La expresión incrementada de Ipl1 y Sli15 conduce a inestabilidad del huso, especialmente en la zona media. Puesto que esta inestabilidad podría estar asociada a los problemas de segregación cromosómica y, en consecuencia, a la letalidad celular que determina el aumento de actividad quinasa Ipl1, decidimos dilucidar las causas de dicha inestabilidad en el huso para tratar de revertirla. La falta de estabilidad en el huso mitótico observada tras la sobreexpresión de Ipl1 y Sli15 podría en principio deberse a una deslocalización del CPC, debido a que la regulación de la actividad y la localización del complejo están íntimamente relacionadas (76). No obstante, el análisis de la localización de Bir1 demuestra que, a pesar de su acumulación centromérica, el complejo se localiza también en el huso tras la sobreexpresión de Ipl1 y Sli15. Una vez localizado el CPC en la zona media del huso, Aurora B regula un gran número de proteínas asociadas a microtúbulos, como es el caso de Ase1/PRC1 (258). Ase1 presenta siete sitios de fosforilación consenso de Ipl1 y es fosforilada por dicha quinasa *in vitro* (258). Nuestros resultados indican que el colapso prematuro del huso durante su elongación en células que sobreexpresan Ipl1 y Sli15 se debe a una función defectiva de Ase1, como consecuencia de la hiperfosforilación de dicha proteína tras el incremento de actividad Ipl1. En línea con este hecho, la expresión del alelo *ase1-5A* recupera parcialmente los defectos observados en la estabilidad del huso a causa del incremento de actividad quinasa Ipl1. Por otro lado, también hemos demostrado que la sobreexpresión de Ase1 promueve la estabilización de la zona media del huso en células con niveles incrementados de Ipl1 y Sli15. Sin embargo, y de forma destacada, esta estabilización del huso no es capaz de recuperarlos problemas de segregación cromosómica provocados por la sobreexpresión de Ipl1 y Sli15. Así, las células con incremento de actividad Ipl1 y una zona media del huso estable gracias a la sobreexpresión de Ase1, todavía cosegregan las cromátidas hermanas en la mayoría de los casos.

Debido a que la inestabilidad de la zona media del huso no está relacionada con los severos defectos de segregación cromosómica en las células con expresión incrementada de Ipl1 y Sli15, decidimos buscar una hipótesis alternativa para

explicar la causa de la generación de tales aneuploidías. Aunque es evidente imaginar cómo la falta de una proteína que corrige las uniones microtúbulo-cinetocoro y garantiza la bi-orientación de los cromosomas puede conducir a defectos masivos de segregación, no es obvio explicar por qué su expresión incrementada también conduce a aneuploidía. Como hemos comentado con anterioridad, en *S. cerevisiae*, los cinetocoros permanecen unidos a microtúbulos a través de todo el ciclo celular (318). Por otro lado, y debido a que la duplicación del ADN termina antes que la de los SPBs, las cromátidas hermanas están inicialmente unidas de manera sintética (6, 70, 318). Esto determina que en células con actividad quinasa Ipl1 reducida, las cromátidas hermanas cosegreden preferentemente hacia la célula hija (donde migra el SPB procedente de la división anterior), ya que las células son incapaces de establecer correctamente la bi-orientación (70, 307). En el caso del incremento de actividad quinasa Ipl1, sin embargo, las cromátidas hermanas cosegreden preferencialmente hacia la célula madre. Esto indica que los fenotipos asociados en este caso no se deben a una pérdida de función de Ipl1.

Para explicar la causa de los defectos de segregación cromosómica asociados al incremento de actividad Ipl1, proponemos un modelo según el cual dicha quinasa se acumula en los centrómeros en su forma activa, determinando una continua desestabilización de las uniones microtúbulo-cinetocoro, incluso en el caso de que estas se establezcan de manera anfitélica. De acuerdo con este modelo, Dam1, uno de los sustratos claves de Ipl1 para regular las uniones microtúbulo-cinetocoro, se encuentra hiperfosforilado tras la sobreexpresión de Ipl1 y Sli15. Por otro lado, y mientras que Ipl1 es dispensable una vez que se establecen correctamente las uniones microtúbulo-cinetocoro (70), los defectos en la segregación de los cromosomas se observan incluso cuando *IPL1* y *SLI15* son sobreexpresados tras el establecimiento de la bi-orientación. Adicionalmente, la distancia media entre los centrómeros y los SPBs aumenta después de la elongación del huso en células con actividad quinasa Ipl1 incrementada, lo que sugiere un desenganche temporal de los cinetocoros del huso durante este proceso. De forma interesante, tras la sobreexpresión de Ipl1 y Sli15, pueden observarse incluso cromosomas que se han

quedado sueltos tras la elongación del huso ("*lagging chromosomes*"). Este tipo de cromosomas se encuentra frecuentemente en células de metazoos que sobreexpresan Aurora B (262, 343), y podría explicar por qué en las células de levadura con actividad Ipl1 incrementada ambas cromátidas hermanas son retenidas con mayor frecuencia en la célula madre, donde estas se encuentran inicialmente tras la replicación del ADN. Finalmente, y de acuerdo con que las uniones microtúbulo-cinetocoro están siendo continuamente desestabilizadas y que, por tanto, se están generando cinetocoros vacíos, nuestros resultados demuestran que, a diferencia de lo que ocurre en ausencia de Ipl1 (256), la sobreexpresión simultánea de Ipl1 y Sli15 induce la activación constitutiva de este punto de control.

La activación del SAC inhibe al APC/C y, por consiguiente, mantiene la cohesión entre las cromátidas hermanas y un bloqueo en metafase (31). Sin embargo, esta protección plantea una aparente paradoja: si las cohesinas no están siendo degradadas, ¿por qué las células con niveles elevados de Ipl1 y Sli15 segregan sus cromosomas? Para explicar esta contradicción, postulamos que la ruptura constante de las conexiones microtúbulo-cinetocoro conduce a la elongación del huso debido a que desaparecen las fuerzas de tensión generadas gracias a dichas conexiones y que se contraponen a la actividad de los motores que separan los SPBs. La situación sería, por tanto, similar a la observada en un mutante que no expresa Cdc6, un factor esencial para el inicio de la replicación del ADN (344). Dichas células entran en mitosis sin replicar el ADN, pero la ausencia de una cromátida hermana impide la bi-orientación de los cromosomas y el establecimiento del huso metafásico, lo que determina la activación del SAC (345). No obstante, y debido a la falta de tensión, el huso mitótico se alarga. Las células *cdc6Δ*, al igual que las células con actividad Ipl1 incrementada, se encuentran por tanto en un estado que se ha denominado "prometafase con aspecto de anafase" ("*anaphase-like-prometaphase*") (345, 346), ya que fisiológicamente están en metafase (debido a que el SAC está activo), pero elongan el huso y separan los cromosomas.

Como se ha comentado anteriormente, uno de los fenotipos observados tras la expresión incrementada de Ipl1 y Sli15 es la inestabilidad del huso, especialmente en la zona media. Si bien hemos demostrado que este fenotipo depende de problemas con la función de Ase1, en principio otra posibilidad es que pudiese ser debido a que las células intenten elongar el huso en la fase del ciclo incorrecta. En mutantes incapaces de establecer cohesión entre las cromátidas hermanas y que se bloquean en metafase, las cromátidas no se pueden mantener juntas, y las células intentan elongar el huso a pesar de que el APC/C no se encuentra activo y Pds1 aún no ha sido degradada, lo cual determina una debilitación de la zona media del huso (278). En dichas células, la inactivación del SAC restaura la activación normal del APC/C^{Cdc20} y recupera la estabilidad del huso (278). Los defectos de inestabilidad en la zona media asociados a la sobreexpresión de Ipl1 y Sli15, no obstante, no son aliviados por la delección de *MAD1*. Es importante señalar adicionalmente que la sobreexpresión de Ase1, sin embargo, no puede aliviar los defectos del huso observados en mutantes en las cohesinas bloqueados en metafase. Estos datos demuestran que la inestabilidad del huso debido al incremento de actividad quinasa Ipl1 no se debe a que las células intenten elongar el huso en la fase del ciclo errónea, cuando las condiciones para su elongación aún no han sido establecidas, y reafirman nuestra conclusión de que la inestabilidad es generada por una función alterada de Ase1. De forma interesante, la eliminación del SAC en las células con actividad incrementada de Ipl1 provoca un fallo en la separación de los SPBs, de forma que estas estructuras cosegregan en la mayoría de los casos. La explicación más plausible para este hecho es que la activación del SAC proporcione a las células el tiempo adicional necesario para que el huso metafásico se establezca correctamente en presencia de altos niveles de actividad quinasa Ipl1. Puesto que Ipl1 juega un papel esencial en el desensamblaje del huso, y que la disminución de su actividad da lugar a una elongación excesiva del mismo (347), el aumento de actividad quinasa Ipl1 podría determinar directamente una ruptura prematura del huso que, en ausencia del SAC, impidiese la separación de los SPBs. Alternativamente, el incremento de actividad Ipl1 podría interferir con la separación inicial de los SPBs. En este sentido, se ha demostrado que Ipl1 es

requerida para el mantenimiento de una estrecha asociación entre los cuerpos polares duplicados durante meiosis en células de *S. cerevisiae*(348). Por otro lado, se ha demostrado que Aurora A juega un papel fundamental en la duplicación y separación de los centrosomas en células de eucariotas superiores (349-351), de forma que es posible que, en ausencia de un homólogo de Aurora A en levaduras, sea Ipl1 la que participe en este proceso.

Uno de los últimos fenotipos asociados al incremento de actividad Aurora B en metazoos es que, a pesar de que tiene lugar la segregación de los cromosomas, las células muestran problemas de citocinesis (262, 263). Si bien Ipl1 juega un papel fundamental en la ruta NoCut, implicada en la regulación de la abscisión (213-215), los niveles incrementados de Ipl1 y Sli15 no parecen activar dicho punto de control. Por el contrario, nuestros resultados demuestran que la ausencia de citocinesis en estas células se debe a la activación constitutiva del SAC. Así, la delección de *MAD1* permite la realización de la citocinesis en las células con expresión incrementada de Ipl1 y Sli15. Es importante señalar que la ruta NoCut es funcional en los mutantes del SAC (213), lo cual apoya adicionalmente que esta ruta no esté siendo activada a pesar de los altos niveles de actividad quinasa Ipl1.

La sobreexpresión conjunta de Ipl1 y Sli15 recapitula los problemas en el ciclo celular asociados al incremento de actividad quinasa Aurora B en células de mamíferos, y nos ha permitido profundizar en los mecanismos moleculares que conducen a dichos fenotipos. De hecho, recientemente, y afianzando la validez de nuestros resultados, se ha generado un modelo de sobreexpresión de Aurora B en ratón, que al igual que nuestro modelo en *S. cerevisiae*, presenta problemas de inestabilidad genómica y activación del SAC (343). Dicho ratón, además, presenta propensión a la aparición de ciertos tipos de tumores (343). Una pregunta interesante es por qué en levaduras es necesaria la sobreexpresión de Ipl1 y Sli15 para recapitular los fenotipos asociados a la actividad incrementada de Aurora B en eucariotas superiores. En relación a esto, es importante señalar que Ipl1 es el único miembro de la familia Aurora en *S. cerevisiae*, mientras que en mamíferos hay tres

Aurora quinasas – A, B y C – que muestran diferentes localizaciones subcelulares y funciones (81). Ipl1 posee funciones adicionales que normalmente son llevadas a cabo por Aurora A o C en mamíferos (258, 348, 352). Esto podría explicar que en levaduras sea fundamental la regulación complementaria de la actividad de Ipl1 mediante el control de los niveles de Sli15. Debido a que los fenotipos observados tras la sobreexpresión de Aurora B en líneas celulares humanas presentan similitud con los ocasionados tras el aumento de expresión de Ipl1 y Sli15, nos planteamos si la sobreexpresión del homólogo humano *AURK-B* podría determinar una elevación de su actividad quinasa en células de *S. cerevisiae*. No obstante, y si bien la sobreexpresión de *AURK-B* en la levadura de gemación provoca letalidad celular, como se había descrito previamente para AIM-1 (homólogo de Aurora B en células de rata) (263), los fenotipos asociados a esta sobreexpresión son diferentes a aquellos observados tras el aumento de actividad quinasa Ipl1. Así, las células de levadura que sobreexpresan *AURK-B* no presentan hiperfosforilación de la serina 10 de la histona H3 (a pesar de que esta diana está conservada entre organismos), y muestran un comportamiento similar al de las células con actividad Ipl1 reducida. En consecuencia, nuestros resultados demuestran que la sobreexpresión de *AURK-B* en *S. cerevisiae* se comporta de manera dominante negativa. En relación a estos resultados, cabe destacar que, a pesar de considerarse a Ipl1 como el homólogo funcional de Aurora B, la quinasa de levadura presenta una mayor homología de secuencia con Aurora A, y el dominio catalítico de Aurora A es capaz de complementar parcialmente a temperatura semi-restrictiva al alelo *ipl1-321*(321). Por otro lado, el grado de conservación de secuencia de *INCENP* y *SLI15* es muy bajo, y Sli15 sólo se considera un miembro de la familia de proteínas del centrómero interno por ser el componente de unión y regulador de Ipl1 y poseer una región carboxi-terminal conservada, IN-box, común a todas las proteínas de la familia (353). Esto podría determinar que la proteína Aurora B humana no sea correctamente localizada y regulada por Sli15, siendo incapaz de desempeñar las funciones que se le otorgan en células de eucariotas superiores.

Nuestros resultados resaltan la importancia del control riguroso de la expresión de Aurora B e INCENP para la viabilidad celular, y demuestran que incluso un aumento sutil en los niveles de expresión de *IPL1* y *SLI15*, como el que se logra tras la duplicación de ambos genes bajo el control de sus propios promotores, incrementa la inestabilidad genómica de las células de levadura. Estos datos pueden ser útiles para proporcionar nuevas claves sobre cómo la desregulación de Aurora B puede promover inestabilidad genómica en eucariotas superiores.

4.3 Análisis del incremento simultáneo en los niveles de expresión de Aurora quinasa B e INCENP en líneas celulares humanas

El cáncer es una enfermedad caracterizada por una división incontrolada de las células. Las células tumorales no responden a las señales extracelulares que gobiernan su comportamiento en un tejido, y crecen y se dividen cuando no deberían, además de no responder a los mecanismos de control del ciclo celular. En la mayoría de los casos, el cáncer comienza con cambios en la secuencia del genoma que permiten a una célula dividirse bajo condiciones en las que las células vecinas no lo hacen. El tumor evoluciona a medida que los descendientes de esa primera célula mutante adquieren cambios genéticos adicionales que les permiten saltar, una por una, las barreras que normalmente restringen su proliferación y supervivencia (354-357). La mayoría de las células de los tumores sólidos son aneuploides y muchas presentan inestabilidad cromosómica (CIN), un término que hace referencia a la ganancia o pérdida recurrente de cromosomas durante múltiples divisiones celulares (358-360). Defectos en la captura de los cromosomas por parte del huso mitótico, la cohesión de las cromátidas hermanas, los puntos de control mitóticos o el número de centrosomas, entre otros, pueden provocar divisiones celulares aberrantes, con la consecuente aparición de células aneuploides y la generación de CIN (12, 361-363). Aurora quinasa B está implicada en muchos de estos procesos mitóticos (76), destacando su papel en la corrección de las uniones microtúbulo-cinetocoro erróneas (68). La actividad incorrecta de Aurora B se ha asociado a la aparición de distintos tipos de cáncer (364). En concreto, la sobreexpresión de Aurora B es común en múltiples tumores humanos, donde niveles elevados tanto de esta quinasa como del ARNm que la codifica se asocian frecuentemente a una peor prognosis (223, 227, 230, 267, 321, 365-369). Además, Aurora B forma parte de la firma de expresión génica CIN70, asociada con alta inestabilidad cromosómica en tumores humanos (370).

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral en células de *S. cerevisiae* enfatizan la importancia de la regulación de la expresión de los homólogos Ipl1 y Sli15 para

el control de la ploidía. Aunque la sobreexpresión individual de Aurora B en metazoos provoca fenotipos similares a los causados por el incremento de expresión de Ipl1 y Sli15 en levaduras de gemación (262, 263, 343), existen tumores en los que, además de la quinasa, también se encuentran conjuntamente incrementados los niveles de expresión de su subunidad reguladora INCENP (269). En consecuencia, y tras nuestros hallazgos con el modelo de sobreexpresión de actividad quinasa Ipl1 en levaduras, era de enorme interés evaluar los efectos de la sobreexpresión de *AURK-B* e *INCENP* en células humanas para analizar si, al igual que en *S. cerevisiae*, el incremento conjunto en los niveles de expresión de ambas subunidades del CPC determina efectos deletéreos aditivos sobre el ciclo celular y la segregación de los cromosomas.

En esta Tesis Doctoral, haciendo uso de la línea celular humana RPE1, hemos demostrado que la sobreexpresión conjunta de Aurora B e INCENP conduce a un aumento sinérgico de la actividad Aurora quinasa B. Las células RPE1 con niveles incrementados de Aurora B e INCENP muestran hiperfosforilación de la serina 10 de la histona H3. Esto, de nuevo, está de acuerdo con que tanto la localización como la actividad de Aurora B dependen de INCENP (76), lo que determina que cuando se sobreexpresa Aurora B conjuntamente con INCENP, al igual que en *S. cerevisiae*, se produzca un incremento sinérgico de su actividad quinasa. Es interesante destacar que, en células RPE1, los niveles de expresión de INCENP se incrementan notablemente cuando se sobreexpresa conjuntamente Aurora B. Por tanto, el incremento de expresión de Aurora B parece estabilizar el exceso de proteína INCENP. Por el contrario, los niveles de Aurora B no se modifican tras la sobreexpresión de INCENP, es decir, no se observan diferencias entre los obtenidos tras su sobreexpresión individual y la conjunta con su subunidad reguladora. El hecho de que la variación de la expresión de una de las subunidades del CPC influya en la estabilidad de las demás proteínas del complejo ha sido documentada (371-373). Además, y en línea con nuestras observaciones, recientemente se ha sugerido que la estabilidad de INCENP depende de la fosforilación por parte de Aurora B y Aurora C en su extremo C-terminal (373).

Debido a que Aurora B se encuentra sobreexpresada en un amplio rango de células cancerígenas, normalmente a causa de una desregulación transcripcional (231, 374, 375), esta quinasa ha emergido en la última década como una diana para el tratamiento anticancerígeno, y se han desarrollado múltiples inhibidores de su actividad quinasa (236). En la actualidad, la mayoría de estos inhibidores han sido diseñados para competir con la unión del ATP a la quinasa. Entre ellos, se encuentran hesperadin, ZM447439 y AZD1152 (220, 244). Aunque presentan una elevada especificidad y al igual que otros inhibidores de otras quinasas también análogos del ATP, estos compuestos pueden interferir con la actividad de otras quinasas (244, 376). Por otro lado, es relativamente frecuente la aparición de mutantes de Aurora B resistentes a estos inhibidores (377, 378), por lo que la utilidad y eficacia de estos compuestos es limitada. Recientemente, se están explorando estrategias alternativas para el desarrollo de inhibidores de Aurora B más eficaces. Como se ha comentado, la interacción entre Aurora B e INCENP es esencial para la activación y localización de la quinasa (379). Este hecho, unido a que INCENP también se encuentra sobreexpresado en tumores (269, 380), hace que la disrupción de dicha interacción esté emergiendo como una posible diana terapéutica en el tratamiento del cáncer (381, 382), resaltando la importancia de nuestras investigaciones.

De manera similar a lo observado en *S. cerevisiae*, el incremento de actividad Aurora quinasa B en eucariotas superiores se relaciona con la generación de aneuploidías y el aumento de la inestabilidad genómica (231, 262, 343, 365, 370, 383). En células RPE1, el incremento simultáneo de los niveles de expresión de Aurora B e INCENP conlleva un aumento sinérgico de la inestabilidad genómica, que provoca, en última instancia, letalidad celular. Mientras que la sobreexpresión de Ipl1 y Sli15 en células de levadura conduce a un bloqueo en la transición metafase-anafase, nuestros resultados sugieren que en células RPE1 se desencadena un proceso apoptótico sin bloqueo mitótico. Nuestros datos indican que dichas células presentan una elevada tasa de proliferación en las primeras divisiones celulares pero que, a causa del alto grado de inestabilidad genómica, las

células mueren posteriormente por apoptosis. Si bien no se ha documentado ninguna actividad oncogénica de Aurora B, la expresión aberrante de las quinasas Aurora se ha demostrado que afecta a los genes supresores de tumores dando lugar, en consecuencia, a una mayor agresividad (244, 384). En este sentido, existen datos en la bibliografía que sugieren que Aurora B e INCENP participan en la transformación celular mediada por la forma oncogénica de la proteína Ras (384). Adicionalmente, el incremento de expresión de Aurora B en células embrionarias de hámster defectivas en p53 induce niveles elevados de histona H3 fosforilada en la serina 10 y causa defectos en segregación cromosómica y en citocinesis (262). La progenie de estas células es aneuploide y forma tumores *in vivo* (262). Sin embargo, la sobreexpresión de Aurora B en células silvestres para p53 no permite la generación de una línea estable de células embrionarias de hámster con niveles elevados de expresión de Aurora B (262). En relación con este hecho, se ha sugerido que la sobreexpresión constitutiva y elevada de Aurora B puede inducir muerte celular, posiblemente por fallos mitóticos e inestabilidad cromosómica (231, 365). En consecuencia, durante el desarrollo tumoral, la sobreexpresión de Aurora B puede ser posterior a la pérdida de función de p53 en una secuencia de pasos múltiples hasta la inducción de carcinogénesis.

Actualmente, estamos optimizando nuestro modelo de sobreexpresión de Aurora B e INCENP en líneas celulares humanas, ya que, aunque el aumento de los niveles de expresión de estas proteínas mediante el uso de plásmidos lentivirales nos posibilita estudiar los efectos del incremento de actividad Aurora quinasa B, provoca una alta tasa de letalidad celular. Así, y con el fin de poder llevar a cabo un estudio más detallado de las consecuencias de la elevación de los niveles de expresión de Aurora B e INCENP, hemos generado líneas celulares RPE1 estables (385) que nos permiten la regulación de la expresión de Aurora B e INCENP mediante la adición de tetraciclina al medio de cultivo. Esto nos facilitará en un futuro el control de forma más rigurosa de los niveles de expresión de ambos genes. En este sentido, será de enorme interés analizar si un incremento menor en los niveles de expresión de ambas proteínas conduce *per se* a un aumento de la

inestabilidad genómica y de la proliferación celular o si, como se ha comentado con anterioridad y también se ha sugerido por otros autores, es necesaria la disfunción adicional de p53 para promover el crecimiento tumoral.

En conjunto, nuestros resultados ponen de manifiesto la importancia de la regulación de la expresión tanto de Aurora B como de INCENP, ya que los defectos de su sobreexpresión son aditivos. Estos datos son de gran importancia puesto que, como se ha sugerido previamente (364), la expresión incrementada de INCENP podría ser requerida, junto a la sobreexpresión de Aurora B, para favorecer el proceso tumorogénico en ciertos tipos celulares. Adicionalmente, nuestra investigación puede ayudar en un futuro a entender cómo la sobreexpresión de proteínas del CPC promueve la aneuploidía y el cáncer, una pregunta que aún no se ha respondido y que constituye una de las razones principales por las que el estudio de dicho complejo es una de las áreas más dinámicas y de mayor interés en la investigación de la mitosis.

5 Conclusiones

1. En células de *Saccharomyces cerevisiae*, la eficiente resolución de las uniones microtúbulo-cinetocoro por Ipl1 durante las etapas iniciales del ensamblaje del huso determina que, mientras que la actividad Ipl1 es esencial para la viabilidad de estas células, el SAC sea un mecanismo de salvaguardia que sólo es necesario en situaciones en las que se ve dificultada la unión de los cromosomas al huso.
2. La sobreexpresión simultánea de Ipl1 y Sli15 en *S. cerevisiae* provoca un incremento de la actividad quinasa Ipl1 que conduce a letalidad celular.
3. La sobreexpresión de Ipl1 y Sli15 provoca graves defectos de segregación cromosómica. El incremento de expresión de Ipl1 y Sli15 produce una acumulación de estas proteínas en el centrómero y una actividad incrementada de la quinasa Ipl1 en dicha estructura que determina la desestabilización constitutiva de uniones microtúbulo-cinetocoro, incluso cuando estas ocurren de manera anfitélica.
4. El incremento de actividad quinasa Ipl1 en *S. cerevisiae* conduce a la activación constitutiva del SAC y, en consecuencia, a un bloqueo del ciclo celular que impide la salida de mitosis y la citocinesis.
5. La sobreexpresión de Ipl1 y Sli15 provoca inestabilidad en la zona media del huso mitótico, que se asocia a una alteración de la función de Ase1.
6. La simple duplicación de los genes *IPL1* y *SLI15* en *S. cerevisiae* provoca un incremento en la inestabilidad genómica que pone de manifiesto la necesidad de un riguroso control de la expresión de ambos genes en estas células.

Conclusiones

7. La expresión incrementada de Aurora B e INCENP provoca un aumento sinérgico de la actividad quinasa de Aurora B e incrementa la estabilidad de INCENP en células RPE1 de epitelio pigmentario de la retina humana.
8. El incremento simultáneo de la expresión de Aurora B e INCENP en células RPE1 causa defectos aditivos de inestabilidad genómica y segregación cromosómica, pero no conduce a un bloqueo evidente del ciclo celular.
9. El incremento conjunto de expresión de Aurora B e INCENP en células RPE1 provoca estabilización de p53 y letalidad celular posiblemente asociada a un proceso apoptótico.

6 Materiales

6.1 Organismos modelo

6.1.1 Estirpes de *Escherichia coli*

Las cepas bacterianas usadas para la transformación y la propagación de plásmidos derivan de *Escherichia coli* DH5- α (*f-endA1 gyrA96 hsdR17 Δ lacU169 f80lacZ Δ M15 recA1 relA1 supE44 thi1*).

6.1.2 Estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*

Las estirpes de levadura empleadas en esta Tesis Doctoral derivan del fondo genético W303 (*ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1*), y se recogen en la Tabla 1.

6.1.3 Líneas celulares de humanos

Las líneas celulares usadas en esta Tesis Doctoral han sido:

- **293T (HEK 293T):** Línea celular procedente de riñón embrionario humano e inmortalizada mediante adenovirus, en la que se introdujo el gen que codifica el antígeno SV40T. El cariotipo es complejo y se describe como hipotriploide, ya que la mayoría de las células contienen casi tres copias del número de cromosomas haploide de una célula humana. Esta línea se cultiva y se transfecta con facilidad, usándose habitualmente para producir lentivirus.
- **RPE1 (RPE1-hTERT):** Línea celular procedente de epitelio pigmentario de retina (RPE-340), inmortalizada mediante la expresión de la telomerasa. El

cariotipo es estable y el 90% de las células analizadas contiene 46 cromosomas.

6.2 Reactivos químicos

6.2.1 Antibióticos y otros reactivos para medios selectivos

- **Ampicilina** (Sigma): antibiótico β -lactámico que impide la síntesis de la pared celular de bacterias durante la división celular. Se utilizó a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ para seleccionar cepas de *E. coli* resistentes a este antibiótico.
- **FOA** (ácido 5-fluorótico; Sigma): compuesto que permite la selección de colonias de levaduras auxótrofas para uracilo. Las células de *S. cerevisiae* capaces de metabolizar el uracilo convierten el FOA en un intermediario tóxico que causa su muerte. Se usó a una concentración de 500 $\mu\text{g/ml}$.
- **G418** (Geneticina, Phytotechnology Laboratories): antibiótico aminoglicósido inhibidor de la síntesis de proteínas. Se utilizó a 250 $\mu\text{g/ml}$ para la selección de cepas de *S. cerevisiae* resistentes a este antibiótico.
- **Nourseotricina** (Werner BioAgents): antibiótico aminoglicósido procedente de *Streptomyces noursei*. Se usó a 100 $\mu\text{g/ml}$ para la selección de estirpes de *S. cerevisiae* resistentes a este antibiótico.

6.2.2 Reactivos para el estudio del ciclo celular

- **3MB-PP1** (análogo PP1 III; Calbiochem): análogo del ATP. Se usó a una concentración de 50 μM (a partir de una solución stock preparada en DMSO a 1 mg/ml) para inhibir la actividad del alelo análogo sensible *ipl1-as5*.

- **Calcoflúor** (Sigma): fluorocromo que interacciona con los polímeros de quitina y celulosa. Se usó a una concentración de 1 mg/ml (a partir de una solución stock preparada en agua a 10 mg/ml).
- **Factor alfa** (Sigma): feromona secretada por las cepas de sexo *MAT α* de *S. cerevisiae* y esencial para la conjugación sexual. Se usó a una concentración de 5 μ g/ml (a partir de una solución stock preparada en DMSO a 5 mg/ml) para bloquear las células *MAT α* de *S. cerevisiae* en fase G1.
- **HU** (hidroxiurea; US Biological): inhibidor de la ribonucleótido reductasa. Se usó a una concentración de 200 mM para bloquear la replicación en células de *S. cerevisiae*.
- **IAA** (ácido 3 indol-acético; Sigma):auxina natural. Se usó a una concentración de 500 μ M (en etanol) para inhibir la expresión del alelo *CDC20-AID*.
- **Ioduro de propidio** (Sigma): agente intercalante de ADN. Se usó a partir de una solución stock preparada en agua a 1 mg/ml.

6.2.3 Reactivos empleados para la extracción de proteínas

- **Cóctel completo inhibidor de proteasas** (Roche): cóctel compuesto de inhibidores de proteasas de serina, cisteína y un amplio rango de metaloproteasas.
- **DTT** (ditiotreititol; Sigma): compuesto reductor de puentes disulfuro de proteínas que poseen grupos sulfhidrilos libres.
- **PMSF** (fluoruro de fenilmetilsulfonilo; Sigma): inhibidor de proteasas de serina y cisteína.

6.3 Enzimas

- **DNasa I** (Roche): endonucleasa de ADN de cadena sencilla, ADN de cadena doble y cromatina, no específica de secuencia.

- **Enzimas de restricción** (Takara/NEB): endonucleasas de ADN bicatenario, específicas de secuencia.
- **Fosfatasa alcalina de ADN** (Roche): glicoproteína dimérica de intestino bovino empleada para eliminar los grupos fosfato de los extremos 5' del ADN bicatenario.
- **Fosfatasa alcalina de proteínas** (Sigma): glicoproteína dimérica de intestino bovino empleada para eliminar los grupos fosfato de un amplio rango de proteínas.
- **Glusulasa** (PerkinElmer): mezcla de enzimas de *Helix pomatia* con capacidad de digerir la pared celular de *S. cerevisiae*.
- **Ligasa de ADN del fago T4** (Roche): enzima encargada de catalizar la unión covalente de extremos lineales de ADN bicatenario.
- **Litica** (Sigma): enzima procedente de *Artrobacter luteus* que posee actividad endoglucanasa y proteasa con capacidad de digerir la pared celular de *S. cerevisiae*.
- **MMLV** (Promega): transcriptasa inversa del virus de la leucemia de ratón de Moloney. Se usó para generar ADNc a partir de una muestra de ARN purificada.
- **Polimerasas termoestables de ADN:**
 - **GoTaq** (Promega): ADN polimerasa usada principalmente para realizar PCRs de comprobación.
 - **ExTaq** (Takara): ADN polimerasa de alta fidelidad y alta procesividad capaz de amplificar fragmentos incluso de 20 kb. Debido a sus características, se usó principalmente para la obtención de fragmentos lineales para ser integrados en el ADN genómico de la levadura.
 - **Velocity** (Bioline): ADN polimerasa de amplificación rápida, alta fidelidad y alta procesividad capaz de amplificar fragmentos de más de 5 kb y con regiones ricas en GC. Debido a sus características, se usó principalmente para la clonación de fragmentos.
- **RNasa A** (Roche): endorribonucleasa de ARN de cadena sencilla específica de pirimidina.

- **Tripsina** (Sigma): proteasa de serina usada para eliminar las uniones de las células adherentes al sustrato mediante la proteólisis de la matriz extracelular.
- **Zimoliasa 20T y 100T** (US Biological): mezcla de enzimas de *A. luteus* con capacidad para digerir la pared celular de *S. cerevisiae*. La zimoliasa 20T tiene una actividad lítica de 20000 U/g y la zimoliasa 100T de 100000 U/g. Ambas se prepararon a una concentración de 10 mg/ml en sorbitol 1 M.

6.4 Tampones y soluciones

- **Agua-DEPC**: agua destilada tratada con dietil pirocarbonato (DEPC) al 0,1%, un inhibidor irreversible de ribonucleasas.
- **Tampón fosfato potásico (KPi) 0,1 M (pH = 6,4)**: K_2HPO_4 2,78 mM, KH_2PO_4 7,22 mM.
- **Tampón KPi 0,1 M (pH = 6,6)**: K_2HPO_4 3,81 mM, KH_2PO_4 6,19 mM.
- **Tampón KPi 1 M (pH = 7,4)**: K_2HPO_4 8,02 mM, KH_2PO_4 1,98 mM.
- **Medio de montaje con DAPI**: 100 mg p-fenilendiamina, 400 μ l K_2HPO_4 1 M, 100 μ l KH_2PO_4 1 M, 1,5 ml NaCl 1 M, 1 ml NaN_3 10% (p/v), 8 ml agua miliQ, 90 ml de glicerol. Ajustar a pH = 8. Añadir DAPI a una concentración final de 0,05 μ g/ml.
- **PBS-BSA**: BSA 10 g/l, K_2HPO_4 40 mM, KH_2PO_4 10 mM, NaCl 150 mM, NaN_3 0,1% (p/v).
- **PBS10X**: NaCl 8,19% (p/v), KCl 0,2% (p/v), Na_2HPO_4 1,42% (p/v), KH_2PO_4 0,245% (p/v).
- **PBS-T**: Tween-20 0,1% (v/v) en PBS1X.
- **Photoflo**: photoflo (Kodak) 0,4% (v/v) preparado en agua destilada.
- **Polibrene**: bromuro de hexadimetrino (Sigma) 10 g/l. Preparar en agua miliQ.
- **Ponceau S**: Ponceau S (Sigma) 4,7 g/l, TCA 30 g/l, ácido acético 1% (v/v).

- **Solución I miniprep:** Tris (tris(hidroximetil)aminometano) 25 mM, glucosa 50 mM, EDTA 10 mM (pH = 8).
- **Solución II miniprep:** NaOH 200 mM, SDS 1% (p/v).
- **Solución III miniprep:** acetato potásico 25% (p/v). Ajustar a pH = 4,8.
- **Solución de permeabilización:** tritón 0,2% (v/v) en PBS 1X.
- **Sorbitol-KAc:** acetato potásico 2% (p/v), sorbitol 1M. Ajustar a pH = 7.
- **Sorbitol-Citrato 1,2M:** K₂HPO₄ 17,418 g/l, ácido cítrico 7 g/l, sorbitol 218,64 g/l. **Tampón SDS 3X:** Tris-HCl 187,5 mM (pH = 6,8), β-mercaptoetanol 6% (v/v), 15 ml glicerol, SDS 9% (p/v), azul de bromofenol 50 g/l.
- **Tampón Laemli 5X:** 30 ml Tris-HCl 1 M (pH = 6,8), 10 g SDS, 50 ml glicerol, 20 ml β-mercaptoetanol 5% (v/v), 250 mg azul de bromofenol.
- **Tampón de bloqueo de preparaciones cromosómicas:** gelatina (Sigma) 0,2% (p/v), BSA 0,5% (p/v). Preparar en PBS 1X.
- **Tampón de rotura de ADN:** Tritón 2% (v/v), SDS 1% (p/v), NaCl 0,1 M, Tris-HCl 10 mM (pH = 8), EDTA 1 mM (pH = 8).
- **Tampón TE:** Tris-HCl 50 mM (pH = 7,5), EDTA 1 mM (pH = 8).
- **Tampón de rotura de proteínas:** 966,25 μl TE1X, 2,75 μl DTT 1M, 11 μl PMSF 100 mM, 20 μl cóctel de inhibidores de proteasas.
- **Tampón de electroforesis de proteínas 5X:** Tris 15 g/l, glicina 72 g/l, SDS 0,5% (v/v).
- **Tampón de transferencia de proteínas 5X:** Tris 15 g/l, glicina 72 g/l, SDS 0,1% (v/v).
- **Tampón HBS 2X:** Hepes 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM (pH = 8), Tween-20 0,005% (v/v).
- **Tampón MES-Sorbitol:** sorbitol 1 M, MES 0,1M, EDTA 1 mM (pH = 8), MgCl₂ 0,5 mM. Ajustar a pH = 6,4.
- **Tampón MES:** MES 0,1 M, EDTA 1 mM (pH = 8), MgCl₂ 0,5 mM. Ajustar a pH = 6,4.
- **Tampón para Fosfatasa Alcalina de proteínas:** Tris 50 mM, MgCl₂ 1 mM. Ajustar a pH = 9.
- **Tampón TAE:** Tris 40 mM, ácido acético glacial 20 mM, EDTA 1 mM (pH = 8).

- **Tampón TES:** 5 ml Tris-HCl 1 M (pH = 7,5), 10 ml EDTA 0,5 M (pH = 8), 12,5 ml SDS 20 % (p/v), 472,5 ml agua-DEPC.
- **TBS 10X:** NaCl 8% (p/v), KCl 0,2% (p/v), Tris 3% (p/v), pH = 7,4.
- **TBS-T:** Tween-20 0,1% (v/v) en TBS1X.
- **TRAFO:** 240 µl PEG 50%, 36 µl acetato de litio 1 M, 10 µl esperma de salmón 2 mg/ml, X µl de ADN (donde X es la cantidad de ADN seleccionada para la transformación), 74-X µl H₂O por reacción de transformación de *S. cerevisiae*.

6.5 Medios de cultivo

6.5.1 Medios de cultivo para *Escherichia coli*

- **Medio rico LB (Luria-Bertani):** LB-Broth Lennox (Formedium) 1% (p/v).

6.5.2 Medios de cultivo para *Saccharomyces cerevisiae*

- **Medio YPA:** extracto de levadura 1% (p/v), peptona bacteriológica 2% (p/v), adenina 20 mg/ml.
- **Medio rico YPAD:** Medio YPA con glucosa 2% (p/v).
- **Medio rico YPA-Gal:** Medio YPA con galactosa 2% (p/v).
- **Medio rico YPA-Raf:** Medio YPA con rafinosa 2% (p/v).
- **Medio rico YPA-Raf/Gal:** Medio YPA-Raf con galactosa 2% (p/v).
- **Mezcla de requerimientos:** mezcla de los requerimientos y potenciadores del crecimiento sólidos en las siguientes proporciones: alanina 1X, arginina 1X, asparragina 1X, ácido aspártico 1X, cisteína 1X, glutamina 1X, ácido glutámico 1X, glicina 1X, inositol 1X, isoleucina 1X, lisina 1X, fenilalanina 1X, prolina 1X, serina 1X, treonina 1X, tirosina 1X, valina 1X, adenina 0,25X.
- **Medio S:** YNB (base nitrogenada de levadura) 0,67% (p/v), mezcla de

requerimientos 0,13% (p/v), triptófano 0,002% (p/v), histidina 0,002% (p/v), leucina 0,012% (p/v), metionina 0,002% (p/v), uracilo 0,002% (p/v).

- **Medio mínimo SD:** Medio S con glucosa 2% (p/v).
- **Medio mínimo S-Gal:** Medio S con galactosa 2% (p/v).
- **Medio mínimo S-Raf:** Medio S con rafinosa 2% (p/v).
- **Medio mínimo S-Raf/Gal:** Medio S-Raf con galactosa 2% (p/v).
- **Medio mínimo SD-MET:** YNB0,67% (p/v), mezcla de requerimientos 0,13% (p/v), glucosa 2% (p/v), triptófano 0,002% (p/v), histidina 0,002% (p/v), leucina 0,012% (p/v), uracilo 0,002% (p/v).
- **Medio mínimo S-Raf-MET:** YNB 0,67% (p/v), rafinosa 2% (p/v), mezcla de requerimientos 0,13% (p/v), triptófano 0,002% (p/v), histidina 0,002% (p/v), leucina 0,012% (p/v), uracilo 0,002% (p/v).
- **Medio mínimo S-Raf/Gal-MET:** Medio S-Raf-MET con galactosa 2% (p/v).
- **Medio S-Raf-LEU:** YNB 0,67%, mezcla de requerimientos 0,13% (p/v), rafinosa 2% (p/v), triptófano 0,002% (p/v), histidina 0,002% (p/v), metionina 0,002% (p/v), uracilo 0,002% (p/v).
- **Medio S-Raf/Gal-LEU:** Medio S-Raf-LEU con galactosa 2% (p/v).
- **Medio de esporulación:** acetato potásico 1% (p/v), extracto de levadura 0,1% (p/v), glucosa 0,05% (p/v), mezcla de requerimientos 0,03% (p/v), triptófano 0,0005% (p/v), histidina 0,0005% (p/v), leucina 0,003% (p/v), metionina 0,0005% (p/v), uracilo 0,0005% (p/v).

6.5.3 Medios de cultivo para líneas celulares

- **Medio completo:** DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Sigma) suplementado con suero fetal bovino 10% (v/v), L-Glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml.
- **Medio completo con Polibrene:** medio completo DMEM con polibrene 8 µg/ml.

7 Métodos

7.1 Conservación de estirpes, cepas bacterianas y líneas celulares

7.1.1 *Escherichia coli*

Para su conservación, las cepas bacterianas se crecían durante toda la noche en medio LB líquido con antibiótico. Al día siguiente, se congelaban en glicerol al 20% en viales a -80°C.

7.1.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Para su conservación, las estirpes de levadura se guardaban a partir de biomasa crecida en placa. Las células se resuspendían en glicerol al 20% y se conservaban a -80°C.

7.1.3 Líneas celulares

Para su conservación, las líneas celulares se congelaban a una concentración de 10^6 células/ml en DMSO al 10% a -80°C en un baño de isopropanol. Tras una semana a -80°C, los viales se pasaban a tanques de nitrógeno líquido, donde se conservaban de manera definitiva.

7.2 Extracción de ácidos nucleicos

7.2.1 Extracción de ADN plasmídico de *Escherichia coli* (miniprep)

Para la extracción de ADN plasmídico de bacterias se usó un método basado en la lisis alcalina. En concreto, se inoculaba una colonia de *E. coli* en 3 ml de medio LB con antibiótico durante toda la noche a 37°C. Posteriormente, se recogía el cultivo mediante centrifugación y las células se resuspendían en 100 µl de Solución I fría, tras lo cual se añadían 200 µl de Solución II preparada en el momento, invirtiendo el tubo varias veces para provocar la lisis celular. A continuación, se adicionaban 150 µl de Solución III, se repetía de nuevo la mezcla por inversión y se incubaba durante 5 minutos en hielo. Pasado este tiempo, la muestra se centrifugaba 15 minutos a 13000 rpm y a 4°C, y el sobrenadante se transfería a un tubo con etanol absoluto (Emsure) frío para precipitar el ADN durante aproximadamente 2 horas a -20°C. Tras la precipitación, la muestra se centrifugaba de nuevo 15 minutos a 13000 rpm y a 4°C. El *pellet* se dejaba secar en una campana de extracción y, una vez seco, se resuspendía en agua miliQ y se conservaba a -20°C.

7.2.2 Extracción de ADN genómico de *Saccharomyces cerevisiae*

Para la extracción de ADN genómico de levadura, se disolvía biomasa de la estirpe de interés en 500 µl de TE 1X y se recogían las células por centrifugación. El *pellet* obtenido se trataba con 250 µl de fenol-cloroformo (Sigma), 250 µl de tampón de extracción de ADN y aproximadamente el mismo volumen de bolas de vidrio (Sigma). La muestra se agitaba con un vórtex a máxima velocidad durante 15 minutos y a 4°C, y a continuación se centrifugaba otros 15 minutos a 13000 rpm para separar la fase acuosa de la fase fenólica. La fase acuosa se pasaba a un tubo con 1 ml de etanol absoluto frío y se incubaba a -20°C durante al menos 2 horas. Pasado este tiempo, la muestra se volvía a centrifugar 15 minutos a 13000 rpm y a

4°C. El *pellet* se dejaba secar en una campana de extracción y, una vez seco, se resuspendía en agua miliQ y se conservaba a -20°C.

7.2.3 Extracción de ARN de *Saccharomyces cerevisiae*

Para la extracción de ARN de levadura, se partía de un cultivo de 5 ml crecido durante toda la noche, que se diluía hasta $D.O_{600nm} = 0,2$ en 10 ml de medio. Una vez que el cultivo diluido alcanzaba una $D.O_{600nm} \simeq 1$, las células se recogían mediante centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos y se resuspendían en 1 ml de agua fría. A continuación, las células se transferían a un tubo nuevo y se centrifugaban 10 segundos a 13000 rpm y a 4°C. El *pellet* obtenido se resuspendía en 400 µl de tampón TES y se añadían 400 µl de fenol-ácido (Sigma). La muestra se agitaba con el vórtex durante 10 segundos a máxima velocidad y, posteriormente, se incubaba durante 45 minutos a 65°C, agitando suavemente cada 15 minutos para evitar la decantación. Pasado este tiempo, la muestra se incubaba en hielo durante 5 minutos, tras lo cual se centrifugaba 5 minutos a 13000 rpm y a 4°C. La fase acuosa obtenida se transfería a un tubo nuevo, se añadían 400 µl de fenol ácido y se agitaba vigorosamente. A continuación, se repetía la operación: la muestra se dejaba en hielo durante 5 minutos y se volvía a centrifugar. El sobrenadante se pasaba a un tubo nuevo, se añadían 400 µl de cloroformo (Sigma) y la mezcla se agitaba en el vórtex a máxima velocidad durante 10 segundos. Tras la agitación, la muestra se centrifugaba 5 minutos a 13000 rpm y a 4°C. Se tomaban 300 µl de la fase acuosa y se añadían 30 µl de acetato potásico 3 M y 1 ml de etanol absoluto frío. Para precipitar el ARN, la muestra se incubaba a -20°C durante al menos 30 minutos. Tras la precipitación, se centrifugaba 5 minutos a 13000 rpm y a 4°C y el *pellet* obtenido se lavaba con etanol al 70% frío. Para eliminar el etanol, la muestra se centrifugaba de nuevo y el *pellet* se dejaba secar en una campana de extracción. Una vez seco, se resuspendía en 50 µl de agua-DEPC y se calentaba durante 15 minutos a 65°C. Por último, para comprobar la calidad del ARN extraído, se corría un décimo de la muestra en un gel de agarosa al 1% y se

cuantificaba la concentración de ARN obtenida con ayuda de un espectofotómetro para micro-volúmenes de muestra (NanoDrop 1000, Thermo).

7.3 Transformación de *Escherichia coli*

Para la transformación de plásmidos en bacterias, se mezclaban 100 µl de bacterias quimiocompetentes con el ADN de interés y se incubaban en hielo durante 30 minutos. Posteriormente, se aplicaba un choque térmico durante 45 segundos a 42°C y las bacterias se incubaban 5 minutos en hielo. A continuación, se añadía 1 ml de medio LB y la mezcla se incubaba a 37°C durante 45 minutos en rotación suave. Por último, las bacterias se recogían por centrifugación y se sembraban en placas con el medio adecuado.

7.4 Obtención de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

7.4.1 Generación de estirpes mediante cruces genéticos

Para la generación de estirpes mediante cruces genéticos se mezclaba biomasa de las estirpes parentales en placas que permitían el crecimiento de las mismas, y la mezcla se incubaba durante toda la noche a temperatura permisiva para los dos parentales. Pasado este tiempo, se tomaba biomasa de esta mezcla, se sembraba en forma de zig-zag en placas apropiadas para la selección de diploides y se incubaba a la temperatura adecuada hasta la aparición de colonias. Las células de las colonias de diploides se sembraban en forma de parches en placas que permitían el crecimiento de ambos parentales. Tras dejarlos crecer 24 horas a temperatura permisiva, las placas con los parches de diploides se replicaban en placas con medio de esporulación y se incubaban a 26°C hasta comprobar al microscopio óptico la existencia de tétradas. Las tétradas resultantes se trataban con zimoliasa

20T a 1 mg/ml durante 7 minutos con el objetivo de digerir el asca que mantiene unidas a las esporas y, posteriormente, se diseccionaban usando un micromanipulador (Singer SMS system 200). El genotipo de las esporas se analizaba mediante réplicas en los distintos medios selectivos, y el sexo se determinaba según la capacidad de las esporas de formar diploides con cepas *MATa* y *MATα* con las mutaciones complementarias al fondo genético W303 (“mating testers”).

7.4.2 Transformación

Para la transformación de plásmidos o fragmentos lineales de ADN en levaduras, se partía de un cultivo en fase exponencial. Las células se recogían por centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos y se lavaban con agua miliQ. Una vez lavadas, se resuspendían en acetato de litio 0,1 M y se centrifugaban de nuevo 2 minutos a 3000 rpm. Posteriormente, las células se resuspendían en 360 µl de solución TRAF0 preparada en el momento, y se incubaban en rotación 30 minutos a 30°C. Pasado este tiempo, las células se sometían a un choque térmico a 42°C durante 15 minutos. Por último, se recogían mediante centrifugación a 3000 rpm durante 2 minutos y se sembraban en los medios selectivos pertinentes. En el caso de que el marcador de selección fuese la resistencia a una determinada droga o antibiótico, el resultado de la transformación se sembraba en placas de medio no selectivo y, al día siguiente, se replicaban en medio selectivo.

7.4.3 Delección y etiquetado de genes

La delección y el etiquetado de genes en cepas de *S. cerevisiae* se llevó a cabo mediante el método descrito en Longtine et al., 1998 (386). Esta estrategia se basa en la amplificación de un fragmento de ADN que contiene el marcador de selección

y/o el epítipo específico, al que se añaden extremos de homología a la región del ADN de interés. Estas regiones de homología permiten la integración en el genoma de la levadura del fragmento amplificado mediante recombinación homóloga. La comprobación del etiquetado y la delección de genes se realizó mediante PCR convencional usando cebadores externos a la zona reemplazada o etiquetada. El etiquetado de las proteínas también se comprobó mediante análisis Western.

7.4.4 Construcción del alelo condicional *pMET3-Ub-DHFR-IPL1*

Para la generación del alelo condicional *pMET3-Ub-DHFR-IPL1*, en primer lugar, se clonó en un plásmido el promotor del gen *MET3* (*pMET3*) seguido de un módulo de degradación *Ub-DHFR* (261), que induce la degradación de la proteína marcada a 37°C. Siguiendo la misma estrategia explicada en el apartado 7.4.3., se reemplazó el promotor de *IPL1* por el casete *pMET3-Ub-DHFR*. La sustitución del promotor de *IPL1* por el casete *pMET3-Ub-DHFR* se comprobó mediante PCR convencional.

7.4.5 Construcción de los mutantes de sobreexpresión

Los genes *IPL1*, *SLI15*, *BIR1*, *ASE1* y *GLC7* se amplificaron mediante PCR desde ADN genómico de la estirpe silvestre W303 (F496) y se clonaron bajo el control del promotor *pGAL1-10* (amplificado de la misma estirpe silvestre) en plásmidos integrativos de la serie de plásmidos pRS (387). Tras verificar la secuencia, estos plásmidos se integraron en el ADN de la levadura en el *locus* de los genes *URA3*, *TRP1* ó *HIS3*, según el marcador de selección que portaba cada plásmido, de forma que las estirpes resultantes mantuviesen intacto los *loci* originales de los genes clonados. En el caso de la construcción de *pGAL-AURK-B*, el ADNc de *AURK-B* se amplificó desde un plásmido proporcionado por el laboratorio de Erik Nigg.

7.4.6 Construcción de los alelos *ipl1-as5* y *ipl1-D227A*

Para la obtención de un mutante de Ipl1 sensible al análogo del ATP 3MB-PP1, se clonó el alelo *ipl1-as5* de la estirpe *SBY5456* (254), incluyendo el promotor y el terminador de la transcripción, en el plásmido pRS303 (387). Esta construcción se integró en el promotor endógeno de *IPL1* en una estirpe en la que previamente se había deletado este gen, y que se mantenía viva expresando Ipl1 desde un plásmido centromérico cuyo marcador de selección era el gen *URA3*. Los transformantes que habían integrado el plásmido con la versión mutada de Ipl1 se sembraron posteriormente en placas de FOA para perder el plásmido centromérico con el alelo silvestre de *IPL1*.

Para la obtención del alelo de Ipl1 que no posee actividad quinasa, *ipl1-D227A* (266), empleamos una estrategia basada en PCRs solapantes que se describe en la Figura M1.

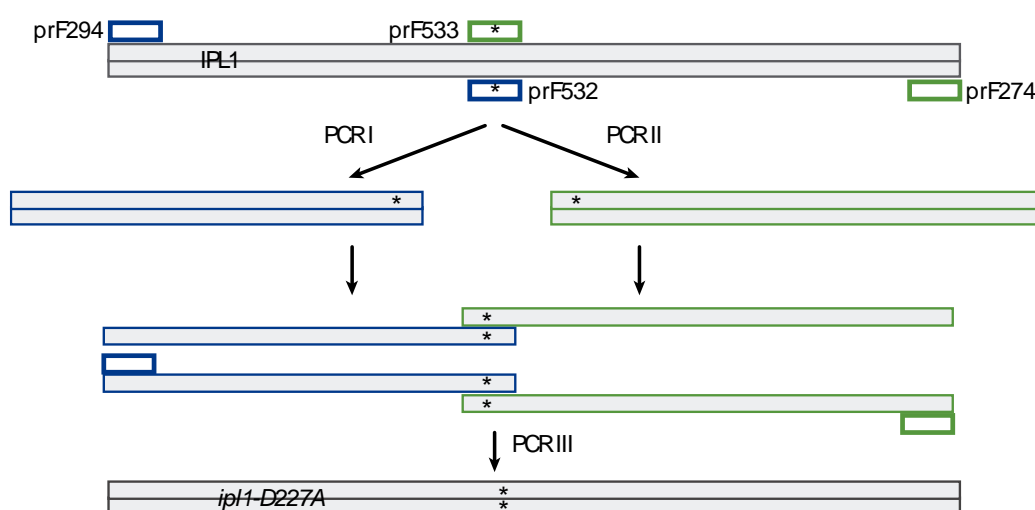


Figura M1. Esquema de la PCR solapante llevada a cabo para la obtención del alelo *ipl1-D227A*. En primer lugar, se llevaron a cabo las PCRs I y II para obtener dos fragmentos que solapan en la región en la que se encuentra el nucleótido que queremos sustituir (*). Para la PCR I, se usaron los cebadores prF294 (IPL1-cloning-fwd) y prF533 (IPL1-kinase-dead-rvs) y para la PCR II los cebadores prF533 (IPL1-kinase-dead-fwd) y prF274 (IPL1-cloning-rvs2). Tanto el cebador prF532 como el prF533 son mutagénicos: tienen un nucleótido cambiado con respecto a la secuencia del gen original. A continuación, se mezclaron los productos de amplificación obtenidos de las PCRs I y II. La mezcla de ambos productos constituía el molde para la PCR III, sobre el que se usaron los cebadores prF294 y prF274 para amplificar la ORF completa con la mutación de interés.

7.4.7 Construcción del alelo *CDC20-AID*

Para la construcción del alelo condicional *CDC20-AID*, se usó la estrategia descrita en *Nishimura et al.* (388). En resumen, se amplificó un casete que contenía el módulo *AID* (“*auxin inducible degron*”) seguido de un marcador de selección desde el plásmido pMK43 (388). Los cebadores usados para la amplificación de este fragmento incluyen extremos de homología para su integración en el genoma de la levadura en el extremo C-terminal de *CDC20*. Posteriormente, el producto de amplificación se transformó la estirpe *YNK54* (388). Dicha estirpe expresa el regulador *OsTIR1* que, en presencia de auxina, desencadena la proteólisis de las proteínas fusionadas a AID.

7.5 Cultivo y modificación de líneas celulares

7.5.1 Subcultivo de líneas celulares adherentes

Para el subcultivo de líneas celulares adherentes, se lavaba con PBS 1X la placa de cultivo con células. A continuación, se añadía un volumen de tripsina correspondiente a 1/10 del volumen de medio en el que se habían cultivado las células. La tripsinización se llevaba a cabo a 37°C durante 5 minutos (o hasta que todas las células de la placa estuvieran en suspensión). Con el fin de neutralizar la tripsina, se añadía el volumen que restaba de medio, se recogía todo en un tubo y se calculaba el número de células obtenidas haciendo uso de una cámara de Neubauer. A continuación, las células se centrifugaban 5 minutos a 1500 rpm y el *pellet* se resuspendía en medio completo fresco. Por último, se sembraba el número de células deseado en una placa nueva y se dejaban crecer a 37°C.

7.5.2 Transfección

Las líneas celulares se transfectaban usando el agente de transfección GeneJuice (MerckMillipore) a una proporción de 3 μ l por μ g de plásmido transfectado, y siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

7.5.3 Producción de lentivirus

Para la producción de lentivirus, se sembraban 2,7 millones de células 293T en placas de 10 cm y se cultivaban durante toda la noche. Tras 24 horas, se transfectaban las células con 15 μ g del vector de interés y 10 μ g y 5 μ g de los vectores que codifican los genes de la cápsida (*p8.91*) y los de la envuelta (*pVSVG*) de los lentivirus, respectivamente. La transfección de estos plásmidos se llevaba a cabo con fosfato cálcico. Para ello, los vectores se mezclaban con 64 μ l de CaCl_2 2M y se completaba con agua miliQ hasta un volumen final de 500 μ l. Sobre este volumen se añadían 500 μ l de HBS 2X gota a gota mientras la mezcla se burbujeaba. Posteriormente, se incubaba 30 minutos a temperatura ambiente y, pasado este tiempo, se añadía todo el volumen lentamente sobre las células de la placa y se incubaban durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente, se eliminaba el medio de cultivo y se lavaba la placa con las células con PBS 1X. A continuación, se añadían 8 ml de medio de completo y las células se dejaban en cultivo durante 48 horas. Finalmente, se tomaba el medio (en el que ya debían de estar los virus) con una jeringa y se filtraba, vertiendo el volumen recogido en tubos de ultracentrífuga. Los tubos se centrifugaban 1,5 horas a 22000 rpm. El *pellet* obtenido se resuspendía en 500 μ l de medio completo frío y se alicuotaba en criotubos para su posterior congelación a -80°C.

7.5.4 Titulación de lentivirus

Para la titulación de los lentivirus producidos, se sembraban cuatro pocillos con 25000 células 293T por cada tipo de virus en placas de 12 pocillos, y se dejaban en cultivo. Al día siguiente, se retiraba el medio de cada pocillo y se añadían 300 µl de medio completo con polibrene y con 0, 5, 10 ó 20 µl de una dilución 1/10 de virus, tras lo cual las células se dejaban en cultivo durante 72 horas a 37°C. Pasado este tiempo, las células se recogían mediante tripsinización y se centrifugaban 5 minutos a 1500 rpm. El *pellet* obtenido se resuspendía en 500 µl de PBS 1X, y una vez resuspendido se analizaba el porcentaje de células GFP positivas con respecto al total mediante citometría de flujo. Las células positivas para GFP correspondían a aquellas que habían sido infectadas como mínimo por una partícula vírica.

7.5.5 Infección con lentivirus

Para infectar las células con lentivirus, en primer lugar, seleccionamos la multiplicidad de infección (MOI), es decir, cuántas partículas víricas añadimos por célula. Por ejemplo, si las células se infectan con $MOI = 2$, se adicionan dos partículas víricas por célula. Los virus se añadían a las células en un volumen de medio completo con polibrene equivalente al 30% del volumen final usado por cada tipo de pocillo. Las células se incubaban durante 6 horas y, posteriormente, se añadía el 70% del volumen restante de medio sin polibrene, dejándolas de nuevo en cultivo a 37°C hasta su análisis.

7.6 Ensayos de viabilidad celular

7.6.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Para comprobar la viabilidad de células de levaduras, se usaron test de diluciones seriadas o de gotas. Con este fin, se crecía un cultivo en agitación durante toda la noche. Al día siguiente, el cultivo se diluía a $D.O_{600nm} = 0,2$ y se dejaba crecer hasta alcanzar una $D.O_{600nm} \approx 0,8$. Posteriormente, se realizaban cinco diluciones seriadas 1/10 en agua miliQ estéril a partir de una dilución original del cultivo a $D.O_{600nm} = 0,3$. Por último, se sembraban 5 μ l de cada dilución en placas con los medios adecuados en cada caso, se dejaban secar en la campana de flujo laminar, y se incubaban a la temperatura correspondiente y el tiempo necesario.

7.6.2 Líneas celulares

Para los ensayos de viabilidad celular de líneas celulares, se sembraban 100000 células y se dejaban crecer durante 48 horas a 37°C. Pasado este tiempo, las células se recogían mediante tripsinización y se calculaba el número de células del cultivo. A continuación, se volvían a sembrar 100000 células por placa. Esta operación se repetía tantas veces como fuesen necesarias durante el tiempo que durase el experimento.

7.7 Ensayo de pérdida de plásmido

Para estudiar la inestabilidad genómica en *S. cerevisiae*, se transformaban las células de las estirpes de interés con el plásmido centromérico pRS316, que porta el gen *URA3* el cual confiere prototrofia para uracilo a las células del fondo genético W303. Las colonias obtenidas se sembraban en forma de zig-zag en medio mínimo

SD completo (es decir, no selectivo) y se cultivaban durante 23 generaciones. Pasado este tiempo, se seleccionaban varias colonias de cada zig-zag, se resuspendían en agua miliQ y se resembraban en placas de medio mínimo completo. Una vez que las colonias habían crecido, las placas se replicaban en medio mínimo sin uracilo para determinar el porcentaje de células que no habían sido capaces de mantener el plásmido y que, por tanto, no crecían en este medio.

7.8 Sincronización de cultivos de *S. cerevisiae*

7.8.1 Sincronización en G1 con factor alfa

Para la sincronización de cepas *MATa* en fase G1, se inoculaban las estirpes y se dejaban crecer durante toda la noche en agitación. Al día siguiente, se diluía el cultivo a $D.O_{600nm} = 0,2$ y se añadía la feromona factor α a una concentración final de 5 $\mu\text{g/ml}$. El cultivo se incubaba en agitación durante una hora y media, y se volvía a añadir factor α a una concentración de 2,5 $\mu\text{g/ml}$. Tras la verificación al microscopio óptico del bloqueo de las células en G1 (esto ocurre normalmente a las 2 horas y media tras iniciar la sincronización), se procedía a la liberación del cultivo. Para ello, se usaba un sistema de vacío consistente en un matraz kitasato acoplado a un filtro sobre el que se colocaba una membrana con tamaño de poro de 0,8 μm (Pall Corporation). Al pasar el cultivo por la membrana, las células quedaban retenidas en esta, pero no así el medio de cultivo con la feromona. A continuación, se lavaba la membrana con diez volúmenes de medio usado para el cultivo con el fin de eliminar los restos de factor α . Por último, se introducía la membrana en un matraz con medio libre de feromona y se agitaba suavemente para resuspender las células.

7.8.2 Sincronización en fase S con hidroxiiurea

Para el bloqueo en fase S haciendo uso de hidroxiiurea, se llevaba a cabo en primer lugar una sincronización en G1 como se describe en el apartado 5.8.1. Las células se liberaban del bloqueo en G1 en medio con hidroxiiurea a una concentración final de 200 mM. Este medio se preparaba justo antes de ser usado mediante la adición de hidroxiiurea en polvo al medio de cultivo previamente atemperado (para favorecer la disolución de la droga).

7.9 Análisis de la progresión del ciclo mediante el estudio de la gemación

Para el análisis de la gemación, se tomaba 1 ml de cultivo y se fijaba en formaldehído al 3,7% en tampón KPi 0,1 M (pH = 6,4) a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, las células se lavaban dos veces con KPi 0,1 M (pH = 6,4) y se resuspendían finalmente en 250 µl de KPi 0,1 M (pH = 6,4). En el momento de ser analizadas, las muestras se sonicaban durante 3 segundos a amplitud 10% (Sonicador Branson). Finalmente, se visualizaban en un microscopio óptico Primo Star (Zeiss) con un objetivo de 40X.

7.9.1 Digestión de la pared celular con liticasa

Para el estudio de la abscisión, las células se digerían con liticasa a una concentración de 80 U/ml durante 10 minutos a 37°C y en rotación. A continuación, las células se centrifugaban 1 minuto a 3500 rpm, se lavaban dos veces con sorbitol 1 M y se resuspendían en 250 µl de sorbitol 1 M.

7.10 Análisis del contenido genómico mediante citometría de flujo (FACS)

7.10.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Para el análisis del contenido de ADN en *S. cerevisiae*, se recogían las células de 1 ml de cultivo y se fijaban en etanol frío al 70% a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, la muestra se lavaba tres veces con PBS 1X y se incubaba con RNasa A (1 µg/ml) en 100 µl de PBS 1X a 37°C durante dos horas. Pasado este tiempo, las células se centrifugaban 1 minuto a 13000 rpm y se trataban con ioduro de propidio (5 µg/ml) en 1 ml de PBS 1X durante al menos una hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Antes de ser analizadas, las muestras se sonicaban durante 3 segundos a amplitud 10%. Finalmente, el estudio del contenido de ADN de las células se llevaba a cabo usando el sistema FACScalibur, y los datos obtenidos se procesaban mediante el software CellQuestPro.

7.10.2 Líneas celulares

Para el análisis del contenido genómico de las células, y con el fin de estudiar también la población no adherente, se recogía tanto el medio de cultivo donde se encontraban las células como el PBS 1X con el que se lavaban las células previamente a su tripsinización. El volumen recogido se centrifugaba durante 5 minutos a 1500 rpm. Sobre este *pellet* se añadía el medio con las células una vez tripsinizadas. Todo este volumen se centrifugaba durante 5 minutos a 1500 rpm, y el *pellet* se lavaba con PBS 1X. Tras el lavado, las células se resuspendían en 200 µl de PBS 1X frío y se añadían 5 ml de etanol frío al 70% gota a gota mientras se agitaban con el vórtex a baja velocidad. Una vez añadido todo el etanol, las células se incubaban a 4°C un mínimo de dos horas y, pasado este tiempo, se recogían mediante centrifugación y se lavaban con 1 ml de PBS 1X frío. El *pellet* obtenido se trataba con RNasa A (250 µg/ml) e ioduro de propidio (10 µg/ml) en 500 µl de

PBS1X, y se incubaba durante 15 minutos a 37°C y en oscuridad. Finalmente, el contenido de ADN de las células se analizaba usando el sistema FACScalibur, y los datos obtenidos se procesaban usando el software CellQuestPro.

7.11 Técnicas de microscopía

7.11.1 Análisis de la localización de proteínas fluorescentes en *S. cerevisiae*

La preparación de células para visualizar proteínas etiquetadas con GFP, eGFP, mCherry o CFP se realizó según el protocolo descrito en *Monje-Casas y Amon, 2009* (389). En resumen, se centrifugaba 1 ml de cultivo durante 1 minuto a 3500 rpm y se fijaba en formaldehído al 2,5% en tampón KPi 0,1 M (pH = 6,4) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, las células se lavaban dos veces con KPi 0,1 M (pH = 6,6), tras lo cual se resuspendían finalmente en KPi 0,1 M (pH = 7,4). Cuando se quería visualizar adicionalmente la morfología nuclear, las células se centrifugaban durante 1 minuto a 3500 rpm y se incubaban en etanol frío al 80% durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células se centrifugaban para eliminar los restos de etanol y, finalmente, se resuspendían en 70 µl de DAPI (10 µg/ml). Las muestras se analizaban usando un microscopio de fluorescencia DM6000 (Leica) equipado con objetivos de inmersión 100x/1.40, filtros A4, L5, TX2 y CFP y una cámara digital DF350 CDD (Leica). Las imágenes de microscopía obtenidas se procesaban usando los programas LAS AF (Leica) e ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

7.11.2 Tinción con calcoflúor

Para la visualización de la pared celular de *S. cerevisiae*, las células se fijaban en formaldehído al 2,5% en tampón KPi 0,1 M (pH = 6,4) durante 15 minutos a

temperatura ambiente, se lavaban dos veces con KPi 0,1 M (pH = 6,6) y, finalmente, se resuspendían en 250 μl de calcoflúor.

7.11.3 Microscopía en tiempo real (*time-lapse*)

Para los experimentos de microscopía en tiempo real de *S. cerevisiae*, se cultivaba la estirpe de interés en medio mínimo durante toda la noche. Al día siguiente, el cultivo se diluía a $\text{D.O.}_{600\text{nm}} = 0,2$ y se dejaba crecer hasta $\text{D.O.}_{600\text{nm}} \approx 0,6$. A continuación, se tomaban 150 μl del cultivo y se añadían en una placa $\mu\text{-dish}$ 35 mm (ibidi). Para inmovilizar las células, se colocaba sobre el volumen de cultivo añadido a la placa un disco de agarosa al 4% preparada en medio mínimo *S.* Posteriormente, para evitar la desecación de la muestra, se añadían 600 μl del medio mínimo usado para el cultivo alrededor del disco de agarosa. Mediante una estación Leica AF6000 y un microscopio DMI6000 con una cámara Hamamatsu ORCA-ER acoplada, se adquirían 7 imágenes seriadas en el eje z espaciadas 0,78 μm en el filtro L5 y DIC cada 2 minutos, y se representaba la proyección máxima.

7.11.4 Inmunofluorescencia

7.11.4.1 Preparación de anticuerpos para inmunofluorescencia

Para todas las técnicas de microscopía de *S. cerevisiae* que requieren el uso de anticuerpos que no reconocen proteínas endógenas, y con objeto de eliminar uniones inespecíficas, se preabsorbieron los anticuerpos anti-HA, anti-ratón-Cy3 y anti-rata-FITC usando esferoplastos de levaduras.

Para la preparación de los esferoplastos, se partía de un cultivo de 50 ml de la estirpe silvestre F496 en fase exponencial ($\text{D.O.}_{600\text{nm}} \approx 0,8$). Las células se

centrifugaban 5 minutos a 3000 rpm, se resuspendían en 50 ml de formaldehído al 3,7% en tampón KPi 0,1 M (pH = 6,4) y se incubaban a 4°C durante toda la noche en rotación. Posteriormente, las células se lavaban tres veces con 50 ml de tampón KPi 0,1 M (pH = 6,4) y se trataban con 100 µl de zimoliasa 100T y 1 ml de glusulasa en 10 ml de sorbitol-citrato 1,2 M a 30°C durante una hora y en agitación. Para parar la digestión de la pared celular, las células se lavaban con 50 ml de sorbitol-citrato 1,2 M y se recogían mediante centrifugación durante 5 minutos a 1000 rpm. Por último, las células, ya esferoplastos, se resuspendían en 5 ml de sorbitol-citrato 1,2 M y se conservaban a -20°C.

Para la preabsorción de los anticuerpos, se mezclaban 200 µl del anticuerpo de interés con 200 µl de esferoplastos de levadura. La mezcla se incubaba en rotación a temperatura ambiente durante 20 minutos. Pasado este tiempo, se centrifugaba 5 minutos a 1000 rpm y el sobrenadante se pasaba a un tubo nuevo donde se volvían a añadir 200 µl de esferoplastos. Esta operación se repetía un total de cinco veces, tomándose como definitivo el sobrenadante de la última centrifugación. Con este procedimiento, se generaba una dilución del anticuerpo preabsorbido de 1/6 con respecto a la concentración original. Por último, se realizaban alícuotas del anticuerpo preabsorbido y se conservaban a -20°C.

7.11.4.2 Inmunofluorescencia para la visualización de tubulina en *S. cerevisiae*

Para la visualización de tubulina mediante inmunofluorescencia se siguió el protocolo descrito en *Visintin et al., 1999(390)*. En concreto, se centrifugaba 1 ml de cultivo durante 1 minuto a 13000 rpm y se fijaba en formaldehído al 3,7% en tampón KPi 0,1 M (pH = 6,4) a 4°C durante toda la noche. Tras la fijación, las células se lavaban dos veces con tampón KPi 0,1 M (pH = 6,4) y se digerían en 222 µl de solución de digestión (200 µl de sorbitol-citrato 1,2 M, 20 µl de glusulasa y 2 µl de zimoliasa 100T) durante aproximadamente 15 minutos a 30°C en rotación. Una vez

digerida, la muestra se centrifugaba durante 2 minutos a 3000 rpm, se lavaba dos veces con sorbitol-citrato 1,2 M y las células se resuspendían en un volumen adecuado de sorbitol-citrato 1,2 M que dependía del tamaño del *pellet*. Posteriormente, se añadían 5 µl de células por pocillo en un portaobjetos previamente tratado con polilisina (Sigma) al 0,1%, y se incubaban en una superficie plana durante 10 minutos. Pasado este tiempo, se retiraba el exceso de células de los pocillos mediante succión con bomba de vacío. El portaobjetos con las células se incubaba durante 3 minutos en metanol frío y, acto seguido, durante 10 segundos en acetona fría. A continuación, se añadían a cada pocillo 5 µl de anticuerpo primario (anti-tubulina; Abcam) a una concentración 1:250 en PBS-BSA y el portaobjetos se incubaba en cámara húmeda durante dos horas a temperatura ambiente. Tras la incubación, los pocillos se lavaban 5 veces con PBS-BSA. Cada lavado consistía en añadir 5 µl del tampón a cada pocillo y retirarlo con la bomba de vacío. Una vez realizados los lavados, se añadían a cada pocillo 5 µl de anticuerpo secundario (anti-rata-FITC; Jackson ImmunoResearch) a una concentración 1:250 en PBS-BSA, y el portaobjetos se incubaba en cámara húmeda durante dos horas a temperatura ambiente y en oscuridad. De nuevo, los pocillos se lavaban 5 veces con PBS-BSA. Por último, se añadía medio de montaje con DAPI a los pocillos, se colocaba el cubreobjetos y se sellaba la preparación con laca de uñas.

7.11.4.3 Preparación de cromosomas mitóticos de *S. cerevisiae*

Para obtener preparaciones de cromosomas mitóticos de *S. cerevisiae* ("*chromosome spreads*"), se centrifugaban 2 ml de cultivo durante 2 minutos a 1500 rpm. El *pellet* se resuspendía en 200µl de sorbitol-KAc, a los que se les añadían 2µl de DTT 1M y 5µl de zimoliasa 20T para digerir la pared celular. Las células se incubaban a 30°C y en agitación durante 20 minutos. Una vez digeridas, las células se centrifugaban 1 minuto a 2000 rpm, y el *pellet* se resuspendía en 1 ml de MES-Sorbitol frío. La muestra se volvía a centrifugar 1 minuto a 2000 rpm, y el *pellet*

obtenido se resuspendía en 200µl de MES frío, añadiendo de forma seguida 720µl de paraformaldehído al 4% (SantaCruz). A continuación, se vertían 250µl de las células ya tratadas sobre el portaobjetos, previamente lavado con etanol absoluto y seco, y se colocaba un cubreobjetos. Esta preparación se incubaba durante 30 minutos a temperatura ambiente con el fin de adherir las células a la superficie del portaobjetos. Pasado este tiempo, se retiraba el cubreobjetos, se lavaba la preparación con *photoflo*, y se dejaba reposar durante 2 minutos. Por último, la preparación se dejaba secar en una campana de extracción y, una vez seca, se seguía con el protocolo de inmunofluorescencia. En concreto, el portaobjetos con las células esparcidas se lavaba con PBS 1X y, a continuación, se incubaba en tampón de bloqueo al menos 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, la preparación se lavaba con PBS 1X y se incubaba con el anticuerpo primario (anti-HA.11; Covance) a concentración 1:250 diluido en tampón de bloqueo a 4°C durante toda la noche en cámara húmeda. Al día siguiente, la preparación se lavaba con PBS 1X y se incubaba con el anticuerpo secundario (anti-ratón-Cy3; Jackson ImmunoResearch) diluido en tampón de bloqueo durante dos horas a temperatura ambiente, en cámara húmeda y en oscuridad. Pasado este tiempo, el portaobjetos se volvía a lavar con PBS 1X y se añadía medio de montaje Vectashield (Vector laboratories) con DAPI (0,5 µg/ml). Finalmente, se colocaba el cubreobjetos y la preparación se sellaba con laca de uñas.

7.11.4.4 Inmunofluorescencia de tubulina de líneas celulares

Para la inmunofluorescencia de líneas celulares adherentes, las células se cultivaban sobre cubreobjetos en placas de 24 pocillos y, posteriormente, se fijaban con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Para eliminar el paraformaldehído, los cubreobjetos con las células se lavaban tres veces con PBS 1X y se incubaban con solución de permeabilización durante 2 minutos a temperatura ambiente. Tras la permeabilización, los cubreobjetos se lavaban con PBS 1X y, acto seguido, las preparaciones se bloqueaban en agitación en BSA 5%

(p/v) disuelto en PBS 1X durante 30 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se retiraba la solución de bloqueo y las células se incubaban en agitación con anticuerpo primario (anti-tubulina; Sigma) a concentración 1:1000 en BSA al 1% (p/v) preparado en PBS 1X durante 30 minutos. A continuación, los cubreobjetos se lavaban tres veces con PBS-T durante 5 minutos y, una vez lavados, se incubaban en agitación con anticuerpo secundario (anti-ratón Alexa Fluor 594; Jackson ImmunoResearch) a concentración 1:15000 en BSA 1% durante 30 minutos, tras lo cual se volvían a lavar tres veces con PBS-T. Posteriormente, las células se incubaban con DAPI (1 µg/ml) en PBS 1X durante 5 minutos, y se lavaban una vez con PBS 1X y una vez con agua destilada. Finalmente, se añadía medio de montaje Vectashield al portaobjetos sobre el que se colocaban los cubreobjetos, sellando después las preparaciones con laca de uñas. Las muestras se analizaban al microscopio de fluorescencia DM6000 (Leica) equipado con objetivos de inmersión 40x/1.40, filtros A4, L5, TX2 y CFP y una cámara digital DF350 CDD (Leica) y las imágenes se procesaban usando los programas LAS AF (Leica) e ImageJ.

7.12 Análisis de los niveles de expresión mediante PCR cuantitativa

Para el análisis de los niveles de expresión mediante PCR cuantitativa, en primer lugar, se eliminaba la posible contaminación de ADN genómico de la muestra de ARN, tratando con 1 U de DNasa I/µg de ARN a 37°C durante 30 minutos. Para inactivar la reacción, se añadía la solución de parada de la DNasa I y se incubaba durante 10 minutos a 65°C. Pasado este tiempo, se añadía una mezcla de hexámeros aleatorios ("*random primers*"; Promega) y se incubaba durante 5 minutos a 70°C, tras lo cual la muestra se pasaba a hielo. Para sintetizar el ADN complementario al ARN, la muestra se trataba con la transcriptasa inversa MMLV y RNAsin (Roche) a 37°C durante una hora, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Una vez listo el ADNc, la cuantificación de los niveles de expresión se llevaba a cabo realizando PCRs cuantitativas en un equipo ABI 7500FAST. Como

reactivo para la PCR se usaba iTaq SYBR Green Supermix (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.13 Extracción de proteínas y análisis Western

7.13.1 Extracción de proteínas de *Saccharomyces cerevisiae*

La extracción de proteínas se realizó según el protocolo descrito en *D'Aquino et al., 2005*(391). En resumen, se centrifugaban 12 ml de cultivo durante 5 minutos a 3000 rpm, y el *pellet* se resuspendía en 10 ml de TCA al 5% (p/v) y se incubaba durante 10 minutos a 4°C. La muestra se volvía a centrifugar durante 5 minutos a 13000 rpm y a 4°C, se retiraba el sobrenadante, y el *pellet* se resuspendía en 1 ml de acetona. Posteriormente, la muestra se agitaba en un vórtex, y se centrifugaba 7 minutos a 13000 rpm y a 4°C. El *pellet* se dejaba secar en una campana de extracción durante al menos dos horas. Pasado este tiempo, se resuspendía en 150 µl de tampón de rotura para proteínas, se añadía el mismo volumen de bolas de vidrio, y se agitaba la mezcla durante 45 minutos en el vórtex a máxima velocidad y a 4°C. Posteriormente, a cada muestra se le añadían 75 µl de tampón SDS 3X, se hervía a 100°C durante 5 minutos en un termobloque y se centrifugaba durante 5 minutos a 13000 rpm y a 4°C. Por último, el sobrenadante se pasaba a un tubo limpio para eliminar los posibles restos celulares del extracto proteico y se conservaba a -20°C hasta su uso.

7.13.2 Extracción de proteínas de líneas celulares

Las células tripsinizadas se resuspendían en tampón Laemli 2X a una concentración final de 10000 células/µl. La muestra se hervía 5 minutos a 96°C y se sonicaba en frío durante 3 ciclos de 30 segundos. Posteriormente, se

centrifugaba durante 15 minutos a 13000 rpm y a 4°C. Por último, el sobrenadante se pasaba a un tubo limpio para eliminar los posibles restos celulares del extracto proteico y se conservaba a -20°C hasta su uso.

7.13.3 Tratamiento de muestras proteicas con fosfatasa alcalina

Para la extracción de proteínas que iban a ser tratadas posteriormente con fosfatasa alcalina, se siguió el protocolo descrito en el apartado 5.13.1., con la salvedad de que se usaba tampón de fosfatasa alcalina en lugar de tampón de rotura de proteínas. Tras la agitación en el vórtex, la muestra se centrifugaba durante 15 minutos a 13000 rpm y a 4°C, y se tomaban 50 µl del sobrenadante para seguir con el tratamiento con fosfatasa alcalina. A los 100 µl restantes se les añadían 50 µl de tampón SDS 3X, se hervían durante 5 minutos y, por último, se centrifugaban y el sobrenadante se pasaba a un tubo limpio. El volumen de muestra tomado para el tratamiento con fosfatasa alcalina se incubaba en rotación suave con 3,3 U de fosfatasa alcalina/µl de muestra durante 12 horas a 37°C. Pasado este tiempo, se añadía tampón SDS 3X a una concentración final de 1X, y la muestra se hervía durante 5 minutos a 100°C. Las muestras tratadas y no tratadas con fosfatasa se conservaban a -20°C.

7.13.4 Análisis Western

7.13.4.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Para la separación electroforética de las muestras proteicas se usaban geles de SDS-poliacrilamida. El porcentaje de acrilamida empleado en cada caso dependía del tamaño de la proteína de interés. Los extractos proteicos se corrían en un sistema Midi-Vertigel 2 (Apelex) a 200 V. Como marcador de peso molecular se

usaba un patrón preteñido de tamaños (ProSieve Color Protein Marker; Lonza). Tras finalizar la electroforesis, las proteínas se transferían desde el gel a una membrana de nitrocelulosa (Hybond-ECL; GE Healthcare) durante 2 horas a 400 mA usando un sistema de transferencia húmeda (Amersham Biosciences). La eficiencia de la transferencia se comprobaba mediante incubación de la membrana con solución Ponceau S. La membrana se bloqueaba, a continuación, durante dos horas a temperatura ambiente y agitación suave, tras lo cual, se incubaba con el anticuerpo primario a 4°C durante toda la noche. Para eliminar el exceso de anticuerpo, la membrana se lavaba tres veces con PBS-T durante 15 minutos y se incubaba con el anticuerpo secundario durante 2 horas a temperatura ambiente. Por último, la membrana se lavaba nuevamente tres veces con PBS-T durante 15 minutos. La detección de las proteínas se llevaba a cabo mediante el sistema de quimioluminiscencia Western Bright ECL System (Advansta).

Las condiciones específicas de bloqueo y de incubación con los anticuerpos se recogen en las Tablas 3 y 4, respectivamente.

7.13.4.2 Líneas celulares

Para la separación electroforética de las muestras proteicas se usaban geles de SDS-poliacrilamida. El porcentaje de acrilamida empleado en cada caso dependía del tamaño de la proteína de interés. Los extractos proteicos se corrían en un sistema Mini-Protean (Biorad) a 70 mA. Como marcador de peso molecular se usaba un patrón preteñido de tamaños. Tras finalizar la electroforesis, las proteínas se transferían desde el gel a una membrana de PVDF (Biorad), previamente activada con metanol, durante 2 horas a 90 V usando un sistema de transferencia húmeda (Biorad). A continuación, la membrana se bloqueaba con el tampón comercial de Odissey (LI-COR Biosciences) durante una hora a temperatura ambiente y agitación suave. Posteriormente, la membrana se incubaba con el anticuerpo primario a 4°C durante toda la noche. Para eliminar el exceso de

Métodos

anticuerpo, la membrana se lavaba tres veces con TBS-T durante 15 minutos, y se incubaba con el anticuerpo secundario a la dilución correspondiente durante 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Pasado este tiempo, la membrana se lavaba tres veces con TBS-T durante 15 minutos, una vez con TBS 1X, y se escaneaba, una vez seca, con un sistema Odyssey CLx usando el programa ImageStudio Odyssey CLx. En el caso del análisis de los niveles de H3, H3S10P y p53, se usaban membranas de nitrocelulosa para la transferencia y como sistema de detección se empleaba la quimioluminiscencia.

Las condiciones específicas de bloqueo y de incubación con los anticuerpos se recogen en las Tablas 3 y 4, respectivamente.

8 Anexos

8.1 Tablas

Tabla 1. Estirpes utilizadas

Estirpe	Genotipo
F142	<i>MATa, pURA3::tetR::GFP::LEU2, cenIV::tetOx448::URA3, mad1::HIS3MX6</i>
F144	<i>MATa, pURA3::tetR::GFP::LEU2, cenIV::tetOx448::URA3, pds1::PDS1-3HA::HIS3MX6</i>
F217	<i>MATa, NDC80-CFP::TRP1, mad2::MAD2-yEGFP-HIS</i>
F256	<i>MATa, pURA3::tetR::GFP::LEU2, cenIV::tetOx448::URA3, trp1::pGAL-IPL1::TRP1</i>
F267	<i>MATa, ipl1-321</i>
F302	<i>MATa, NDC80-GFP::URA3, IPL1-6HA::HIS3MX6</i>
F323	<i>MATa, pURA3::tetR::GFP::LEU2, CenIV::tetOx448::URA3, ipl1-321</i>
F350	<i>MATa, mad1::HIS3MX6</i>
F496	<i>MATa tipo silvestre</i>
F947	<i>MATa, pURA3::tetR::GFP::LEU2, cenIV::tetOx448::URA3, trp1::pGAL-IPL1::TRP1, ura3::pGAL1-10-SLI15::URA3</i>
F953	<i>MATa, pURA3::tetR::GFP::LEU2, cenIV::tetOx448::URA3, ura3::pGAL1-10-SLI15::URA3</i>
F955	<i>MATa, pURA3::tetR::GFP::LEU2, cenIV::tetOx448::URA3</i>
F980	<i>MATa, pURA3::tetR::GFP::LEU2, cenIV::tetOx448::URA3, pds1::PDS1-3HA::HIS3MX6, trp1::pGAL-IPL1::TRP1, ura3::pGAL1-10-SLI15::URA3</i>
F1120	<i>MATa, pURA3::tetR::GFP::LEU2, cenIV::tetOx448::URA3, trp1::pGAL-IPL1::TRP1, ura3::pGAL-SLI15::URA3, his3::pGAL-GLC7::HIS3</i>
F1124	<i>MATa, pIPL1::TRP1-pMET3-UB-DHFR-IPL1</i>
F1191	<i>MATa, pURA3::tetR::GFP::LEU2, cenIV::tetOx448::URA3, pds1::PDS1-3HA::HIS3MX6, trp1::pGAL-IPL1::TRP1</i>
F1196	<i>MATa, pURA3::tetR::GFP::LEU2, cenIV::tetOx448::URA3, pds1::PDS1-3HA::HIS3MX6, ura3::pGAL1-10-SLI15::URA3</i>
F1357	<i>MATa, ura3::pRS306-mCherry-TUB1::URA3, BIR1-yEGFP::SpHIS5</i>
F1359	<i>MATa, leu2::pURA3::tetR-GFP::LEU2, cenV::tetO2x112::HIS3</i>

F1376	<i>MATa, pURA3::tetR::GFP::LEU2, cenIV::tetOx448::URA3, pds1::PDS1-3HA::HIS3MX6, trp1::pGAL-IPL1::TRP1, ura3::pGAL1-10-SLI15::URA3, mad1::HIS3MX6</i>
F1417	<i>MATa, pURA3::tetR::GFP::LEU2, cenIV::tetOx448::URA3, trp1::pGAL-IPL1::TRP1, ura3::pGAL1-10-SLI15::URA3, spc42::SPC42-mCherry::KanMX6</i>
F1483	<i>MATa, spc42::SPC42-mCherry::KanMX6, pURA3::tetR::GFP::LEU2, cenIV::tetOx448::URA3</i>
F1517	<i>MATa, pURA3::tetR::GFP::LEU2, cenIV::tetOx448::URA3, pIPL1::TRP1-pMET3-UB-DHFR-IPL1</i>
F1562	<i>MATa, pURA3::tetR::GFP::LEU2, cenIV::tetOx448::URA3, trp1::pGAL-IPL1::TRP1, ura3::pGAL1-10-SLI15::URA3, spc42::SPC42-mCherry::KanMX6, nup159::NUP159-GFP-TRP1</i>
F1570	<i>MATa, ura3::pAFS125-TUB1-GFP::URA3</i>
F1595	<i>MATa, pIPL1::TRP1-pMET3-UB-DHFR-IPL1-3HA::HIS3MX6</i>
F1611	<i>MATa, CenIV::tetOx448::URA3, trp1::pGAL-IPL1::TRP1, his3::pGAL1-10-SLI15::HIS3, ura3::pRS306-mCherry-TUB1::URA3, BIR1-yEGFP::SpHIS5</i>
F1640	<i>MATa, pURA3::tetR::GFP::LEU2, cenIV::tetOx448::URA3, his3::pGAL-BIR1::HIS3</i>
F1642	<i>MATa, pURA3::tetR::GFP::LEU2, cenIV::tetOx448::URA3, ura3::pGAL1-10-SLI15::URA3, his3::pGAL-BIR1::HIS3</i>
F1644	<i>MATa, pURA3::tetR::GFP::LEU2, CenIV::tetOx448::URA3, trp1::pGAL-IPL1::TRP1, his3::pGAL-BIR1::HIS3</i>
F1646	<i>MATa, pURA3::tetR::GFP::LEU2, CenIV::tetOx448::URA3, trp1::pGAL-IPL1::TRP1, ura3::pGAL1-10-SLI15::URA3, his3::pGAL-BIR1::HIS3</i>
F1670	<i>MATa, pURA3::tetR::GFP::LEU2, CenIV::tetOx448::URA3, pMET-CDC20::URA3</i>
F1696	<i>MATa, pURA3::tetR::GFP::LEU2, cenIV::tetOx448::URA3, ipl1-as5::HIS3::ipl1::KanMX6</i>
F1700	<i>MATa, pURA3::tetR::GFP::LEU2, CenIV::tetOx448::URA3, trp1::pGAL-IPL1::TRP1, ura3::pGAL1-10-SLI15::URA3, ahc1::His3MX6</i>
F1704	<i>MATa, ura3-1::ADH1-OsTIR1-9Myc(URA3), CDC20-AID::kanMX.</i>
F1735	<i>MATa, pURA3::tetR::GFP::LEU2, CenIV::tetOx448::URA3, trp1::pGAL-IPL1::TRP1, ura3::pGAL1-10-SLI15::URA3, his3::pGAL-ASE1::HIS3</i>
F1753	<i>MATa, his3::pIPL1-IPL1::HIS3</i>
F1754	<i>MATa, trp1::pSLI15-SLI15::TRP1</i>
F1803	<i>MATa, ura3::pAFS125-TUB1-GFP::URA3, trp1::pGAL-IPL1::TRP1, his3::pGAL1-10-SLI15::HIS3</i>
F1811	<i>MATa, pURA3::tetR::GFP::LEU2, cenIV::tetOx448::URA3, spc42::SPC42-mCherry::KanMX6,</i>

	<i>nup159::NUP159-GFP-TRP1, trp1::pGAL-IPL1::TRP1, ura3::pGAL1-10-SLI15::URA3, mad1::HIS3MX6</i>
F1845	<i>MATa, pURA3::tetR::GFP::LEU2, CenIV::tetOx448::URA3, trp1::pGAL-IPL1::TRP1, ura3::pGAL1-10-SLI15::URA3, mad1::HIS3MX6</i>
F1901	<i>MATa, leu2::pURA3::tetR-GFP::LEU2, cenV::tetO2x112::HIS3, trp1::pGAL-IPL1::TRP1, ura3::pGAL1-10-SLI15::URA3</i>
F1906	<i>MATa, pURA3::tetR::GFP::LEU2, CenIV::tetOx448::URA3, trp1::GAL-IPL1::TRP1, ura3::pGAL1-10-SLI15::URA3</i>
F1908	<i>MATa, pURA3::tetR::GFP::LEU2, spc42::SPC42-mCherry::KanMX6, CenIV::tetOx448::URA3, trp1::pGAL-IPL1::TRP1, ura3::pGAL1-10-SLI15::URA3, his3::pGAL-ASE1::HIS3</i>
F1910	<i>MATa, pURA3::tetR::GFP::LEU2, CenIV::tetOx448::URA3, spc42::SPC42-mCherry::KanMX6, trp1::pGAL-IPL1::TRP1, ura3::pGAL1-10-SLI15::URA3, his3::pGAL-ASE1::HIS3, mad1::HIS3MX6</i>
F1912	<i>MATa, pURA3::tetR::GFP::LEU2, cenIV::tetOx448::URA3, pds1::PDS1-3HA::HIS3MX6, trp1::pGAL-IPL1::TRP1, ura3::pGAL1-10-SLI15::URA3, his3::pGAL-ASE1::HIS3</i>
F1927	<i>MATa, pURA3::tetR::GFP::LEU2, CenIV::tetOx448::URA3, trp1::pGAL-IPL1::TRP1, ura3::pGAL1-10-SLI15::URA3, mad1::HIS3MX6, spc42::SPC42-mCherry::KanMX6</i>
F1940	<i>MATa, pURA3::tetR::GFP::LEU2, cenIV::tetOx448::URA3, ura3-1::ADH1-OsTIR1-9Myc(URA3), pIPL1::TRP1-pMET3-UB-DHFR-IPL1-3HA::HIS3MX6, CDC20-AID::kanMX.</i>
F1942	<i>MATa, pURA3::tetR::GFP::LEU2, cenIV::tetOx448::URA3, ura3-1::ADH1-OsTIR1-9Myc(URA3), pIPL1::TRP1-pMET3-UB-DHFR-IPL1-3HA::HIS3MX6, CDC20-AID::kanMX, mad1::HIS3MX6.</i>
F1948	<i>MATa, pURA3::tetR::GFP::LEU2, CenIV::tetOx448::URA3, pMET-CDC20::URA3, trp1::pGAL-IPL1::TRP1, ura3::pGAL1-10-SLI15::URA3</i>
F1951	<i>MATa, ura3::pRS306-mCherry-TUB1::URA3, ASE1-yEGFP::SpHIS5</i>
F1956	<i>MATa, pURA3::tetR::GFP::LEU2, cenIV::tetOx448::URA3, IPL1-as5::HIS3::ipl1::KanMX6, mad1::HIS3MX6.</i>
F1963	<i>MATa, NDC80-CFP::TRP1, mad2::MAD2-yEGFP-HIS, trp1::pGAL-IPL1::TRP1, ura3::GAL-SLI15::URA3</i>
F1982	<i>MATa, ura3::pRS306-mCherry-TUB1::URA3, ASE1-yEGFP::SpHIS5, trp1::pGAL-IPL1::TRP1, his3::pGAL1-10-SLI15::HIS3</i>
F1988	<i>MATa, pURA3::tetR::GFP::LEU2, cenIV::tetOx448::URA3, hht1::NatMX4, hht2::[H3S10A]-URA3</i>

F1989	<i>MATa, pURA3::tetR::GFP::LEU2, cenIV::tetOx448::URA3, hht1::NatMX4</i>
F2002	<i>MATa, pURA3::tetR::GFP::LEU2, CenIV::tetOx448::URA3, trp1::GAL-IPL1::TRP1, his3-11,15::pGAL1-10-SLI15::HIS3, hht1::NatMX4</i>
F2008	<i>MATa, pURA3::tetR::GFP::LEU2, cenIV::tetOx448::URA3, trp1::pGAL-ipl1-D227A::TRP1</i>
F2010	<i>MATa, pURA3::tetR::GFP::LEU2, CenIV::tetOx448::URA3, trp1::GAL-IPL1::TRP1, his3-11,15::pGAL1-10-SLI15::HIS3, hht1::NatMX4, hht2::[H3S10A]-URA3</i>
F2019	<i>MATa, his3::pIPL1-IPL1::HIS3, trp1::pSLI15-SLI15::TRP1</i>
F2021	<i>MATa, pURA3::tetR::GFP::LEU2, cenIV::tetOx448::URA3, trp1::pGAL-ipl1-D227A::TRP1, ura3::pGAL1-10-SLI15::URA3</i>
F2242	<i>MATa, pURA3::tetR::GFP::LEU2, cenIV::tetOx448::URA3, his3::pGAL-AURKB::HIS3</i>
F2263	<i>MATa, NDC80-GFP::URA3, IPL1-6HA::HIS3MX6, trp1::pGAL-IPL1-3HA::TRP1, ura3::pGAL1-10-SLI15::URA3</i>
F2273	<i>MATa, DAM1-3HA::HIS3MX6</i>
F2274	<i>MATa, DAM1-3HA::HIS3MX6, trp1::pGAL-IPL1::TRP1, ura3::pGAL1-10-SLI15::URA3</i>
F2288	<i>MATa, trp1::pGAL-IPL1::TRP1, ura3::pGAL1-10-SLI15::URA3, ase1::KanMX, pSB962::ase1-5A::LEU2</i>
F2289	<i>MATa, ase1::KanMX, pSB962::ase1-5A::LEU2</i>
F2290	<i>MATa, scc1::pMET3-SCC1-18Myc::TRP1, cdc20::pMET3-CDC20::URA3</i>
F2291	<i>MATa, scc1::pMET3-SCC1-18Myc::TRP1, cdc20::pMET3-CDC20::URA3, his3::pGAL-ASE1::HIS3</i>
F2299	<i>MATa, ase1::KanMX, pSB152::ASE1::LEU2</i>
F2300	<i>MATa, trp1::pGAL-IPL1::TRP1, ura3::pGAL1-10-SLI15::URA3, ase1::KanMX, pSB152::ASE1::LEU2</i>
F2414	<i>MATa, ipl1-321, mad1::HIS3MX6</i>
F2493	<i>MATa, pURA3::tetR::GFP::LEU2, cenIV::tetOx448::URA3, ipl1-321, mad1::HIS3MX6</i>

Tabla 2. Cebadores

Nombre	Secuencia
IPL1-cloning-fwd	5'-ATTAGAGGATCCATGCAACGCAATAGTTTAGT-3'
Ipl1-cloning-rvs2	5'-ATAAATGAGCTCCATCTGTGATAATTGCTGTG-3'
IPL1-kinase-dead-fwd	5'-GCATAAAAAGAATATTATTCATAGAGCTATTAAACCTGAAAATATAC-3'
IPL1-kinase-dead-rvs	5'-TTAGTATATTTTCAGGTTTAATAGCTCTATGAATAATATTCTTTTT-3'
IPL1-RT-PCR-fwd1	5'-CACTATAGATGCATGGGCTCTTGGCGTC-3'
IPL1-RT-PCR-rvs1	5'-GGGCATTTTGATATCCAGTGCTGCTATCCT-3'
NUP85-RT-PCR-fwd1	5'-CAGCAAAGAGTTTTCTGCATACGTATCAGG-3'
NUP85-RT-PCR-rvs1	5'-ATTAAACACTCTGTCATCACCTAAATCACGG-3'
SLI15-RT-PCR-fwd1	5'-CCTAAATCACTCCGCAGGAAG-3'
SLI15-RT-PCR-rvs1	5'- TGGTGAGGATTTTTTCGCTTTC-3'

Tabla 3. Condiciones de bloqueo usadas en análisis Western

Proteína o epítipo	Origen de la muestra	Tampón de bloqueo
Aurora B	Humano	Odissey
Ciclina B1	Humano	PBS-T leche 5%
Clb2	Levadura	TBS1X leche 5%
GFP	Levadura	PBS-T leche 5%
H3	Levadura, humano	PBS leche 5%
H3S10P	Levadura, humano	PBS leche 5%
HA	Levadura	PBS-T 5% leche
INCENP	Humano	Odissey
Lamina A/C	Humano	Odissey
Lamina B1	Humano	Odissey
Myc	Levadura	PBS-T leche 5%
p53	Humano	PBS-T leche 5%
Pgk1	Levadura	PBS-T leche 5%
Tubulina	Humano	PBS-T leche 5%
Tubulina	Humano	Odissey

Tabla 4. Anticuerpos usados en análisis Western

Proteína o epítopo	Tampón	Anticuerpo primario		Anticuerpo secundario	
		Anticuerpo	Dilución	Anticuerpo	Dilución
S. cerevisiae					
Clb2	TBS Tween-20 0,05% leche 5%	Anti-Clb2 (SantaCruz)	1:2000	Anti-Conejo-HRP (GH Healthcare)	1:10000
GFP	PBS-T leche 1% BSA 1%	JL-8 Living colors (Clontech)	1:1000	Anti-Ratón-HRP (GH Healthcare)	1:2000
HA	PBS-T leche 1% BSA 1%	HA.11 (Covance)	1:5000	Anti-Ratón-HRP (GH Healthcare)	1:10000
Myc	PBS-T leche 1% BSA 1%	Myc9E10 (Covance)	1:5000	Anti-Ratón-HRP (GH Healthcare)	1:10000
Pgk1	PBS-T leche 1% BSA 1%	Anti-Pgk1 (Invitrogen)	1:20000	Anti-Ratón-HRP (GH Healthcare)	1:10000
Líneas celulares					
Aurora B	Odissey Tween-20 0,1%	Anti-Aurora B (Abcam)	1:1000	Anti-Conejo-800CW (LI-COR)	1:15000
Ciclina B1	Odissey Tween-20 0,1%	Anti-Ciclina B1 (SantaCruz)	1:250	Anti-Conejo-800CW (LI-COR)	1:5000
INCENP	Odissey Tween-20 0,1%	Anti-INCENP (Abcam)	1:1000	Anti-Ratón-680-RD (LI-COR)	1:15000
Lamina A/C	Odissey Tween-20 0,1%	Anti-Lamina A/C (SantaCruz)	1:1000	Anti-Conejo-800CW (LI-COR)	1:5000
Lamina B1	Odissey Tween-20 0,1%	Anti-LaminaB1 (Abcam)	1:1000	Anti-Cabra-800CW (LI-COR)	1:5000
p53	PBS-T leche 1%	Anti-p53 (Calbiochem)	1:2500	Anti-Oveja-HRP (DAKO)	1:2500
Tubulina	Odissey Tween-20 0,1%	Anti-Tubulina (Sigma)	1:5000	Anti-Ratón-680-RD (LI-COR)	1:5000
Tubulina	PBS-T leche 2,5%	Anti-Tubulina (Sigma)	1:5000	Anti-Ratón-HRP (GH Healthcare)	1:5000
S. cerevisiae, líneas celulares					
H3	TBS 1X leche 3%	Anti-Histona H3 (Abcam)	1:500	Anti-Conejo-HRP (GH Healthcare)	1:2000
H3S10P	PBS 1X leche 3%	Anti-H3S10P (SantaCruz)	1:500	Anti-Conejo-HRP (GH Healthcare)	1:2000

Tabla 5. Homólogos de proteínas de humanos y de *Saccharomyces cerevisiae*

Humanos	<i>S. cerevisiae</i>
Aurora B	Ipl1
Borealina	Nbl1
BUBR1	Mad3
CDK1	Cdc28
CENP-A	Cse4
CENP-C	Mif2
CENP-T	Cnn1
EB1	Bim1
HEC1	Ndc80
INCENP	Sli15
KNL1	Spc105
Mis12	Mtw1
PRC1	Ase1
Securina	Pds1
Survivina	Bir1

8.2 Abreviaturas

APC/C: Complejo Promotor de Anafase/Ciclosoma.

CDK: Quinasa dependiente de ciclina.

CIN: Inestabilidad cromosómica.

CPC: Complejo pasajero del cromosoma.

D.O.: Densidad óptica.

DEPC: Dietil pirocarbonato.

DIC: Microscopía diferencial de contraste de interferencia.

DTT: Ditioneitol.

FA: Fosfatasa alcalina.

FACS: Citometría de flujo.

FOA: Ácido 5-fluorótico.

HU: Hidroxiurea.

IAA: Auxina natural.

KAc: Acetato potásico.

KP_i: Fosfato potásico.

MCC: Complejo del punto de control mitótico

MET: Metionina.

n.s.: No significativas.

p/v: Porcentaje peso de soluto / volumen de disolución

PCM: Microscopía de contraste de fases.

PFA: Paraformaldehído.

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.

PP1: Proteína Fosfatasa 1.

rpm: Revoluciones por minuto.

SAC: Punto de control de ensamblaje del huso.

SDS: Dodecil-sulfato sódico (*sodium dodecyl sulfate*).

SEM: Desviación estándar de la media.

SPB: Cuerpo polar del huso mitótico.

TCA: Ácido Tricloroacético.

U: Unidad enzimática.

v/v: Porcentaje volumen de soluto / volumen de disolución.

YNB: Base nitrogenada de levadura.

9 Bibliografia

1. C. Norbury, P. Nurse, Animal cell cycles and their control. *Annu Rev Biochem* **61**, 441-470 (1992).
2. K. Vermeulen, D. R. Van Bockstaele, Z. N. Berneman, The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* **36**, 131-149 (2003).
3. F. Uhlmann, A matter of choice: the establishment of sister chromatid cohesion. *EMBO Rep* **10**, 1095-1102 (2009).
4. A. Amon, Together until separin do us part. *Nat Cell Biol* **3**, E12-14 (2001).
5. C. E. Walczak, S. Cai, A. Khodjakov, Mechanisms of chromosome behaviour during mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 91-102 (2010).
6. R. E. Meyer, D. S. Dawson, Attaching to spindles before they form: do early incorrect chromosome-microtubule attachments promote meiotic segregation fidelity? *Cell Cycle* **12**, 2011-2015 (2013).
7. N. Rhind, P. Russell, Signaling pathways that regulate cell division. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**, (2012).
8. S. Guttinger, E. Laurell, U. Kutay, Orchestrating nuclear envelope disassembly and reassembly during mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 178-191 (2009).
9. M. K. Balasubramanian, E. Bi, M. Glotzer, Comparative analysis of cytokinesis in budding yeast, fission yeast and animal cells. *Curr Biol* **14**, R806-818 (2004).
10. I. M. Cheeseman, A. Desai, Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 33-46 (2008).
11. N. London, S. Biggins, Signalling dynamics in the spindle checkpoint response. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 736-747 (2014).
12. A. J. Holland, D. W. Cleveland, Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 478-487 (2009).

13. B. R. Williams, A. Amon, Aneuploidy: cancer's fatal flaw? *Cancer Res* **69**, 5289-5291 (2009).
14. E. A. Foley, T. M. Kapoor, Microtubule attachment and spindle assembly checkpoint signalling at the kinetochore. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**, 25-37 (2013).
15. Y. Yamagishi, T. Sakuno, Y. Goto, Y. Watanabe, Kinetochore composition and its function: lessons from yeasts. *FEMS Microbiol Rev* **38**, 185-200 (2014).
16. K. E. Gascoigne, I. M. Cheeseman, Time for point centromeres. *Nat Cell Biol* **14**, 559-561 (2012).
17. P. Lara-Gonzalez, F. G. Westhorpe, S. S. Taylor, The spindle assembly checkpoint. *Curr Biol* **22**, R966-980 (2012).
18. K. Tanaka *et al.*, Molecular mechanisms of kinetochore capture by spindle microtubules. *Nature* **434**, 987-994 (2005).
19. L. Nezi, A. Musacchio, Sister chromatid tension and the spindle assembly checkpoint. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 785-795 (2009).
20. T. U. Tanaka, M. J. Stark, K. Tanaka, Kinetochore capture and bi-orientation on the mitotic spindle. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 929-942 (2005).
21. E. Manchado, M. Eguren, M. Malumbres, The anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C): cell-cycle-dependent and -independent functions. *Biochem Soc Trans* **38**, 65-71 (2010).
22. B. R. Thornton, D. P. Toczyski, Precise destruction: an emerging picture of the APC. *Genes Dev* **20**, 3069-3078 (2006).
23. J. Pines, Cubism and the cell cycle: the many faces of the APC/C. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 427-438 (2011).
24. J. Zhang, L. Wan, X. Dai, Y. Sun, W. Wei, Functional characterization of Anaphase Promoting Complex/Cyclosome (APC/C) E3 ubiquitin ligases in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* **1845**, 277-293 (2014).
25. A. Musacchio, A. Ciliberto, The spindle-assembly checkpoint and the beauty of self-destruction. *Nat Struct Mol Biol* **19**, 1059-1061 (2012).

Bibliografia

26. C. L. Rieder, R. W. Cole, A. Khodjakov, G. Sluder, The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores. *J Cell Biol* **130**, 941-948 (1995).
27. S. J. Suijkerbuijk *et al.*, The vertebrate mitotic checkpoint protein BUBR1 is an unusual pseudokinase. *Dev Cell* **22**, 1321-1329 (2012).
28. L. H. Hwang *et al.*, Budding yeast Cdc20: a target of the spindle checkpoint. *Science* **279**, 1041-1044 (1998).
29. M. Glotzer, A. W. Murray, M. W. Kirschner, Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**, 132-138 (1991).
30. A. Yamamoto, V. Guacci, D. Koshland, Pds1p, an inhibitor of anaphase in budding yeast, plays a critical role in the APC and checkpoint pathway(s). *J Cell Biol* **133**, 99-110 (1996).
31. A. Musacchio, E. D. Salmon, The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 379-393 (2007).
32. J. M. Peters, The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 644-656 (2006).
33. P. Clute, J. Pines, Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase. *Nat Cell Biol* **1**, 82-87 (1999).
34. A. Hagting *et al.*, Human securin proteolysis is controlled by the spindle checkpoint and reveals when the APC/C switches from activation by Cdc20 to Cdh1. *J Cell Biol* **157**, 1125-1137 (2002).
35. V. Sudakin, G. K. Chan, T. J. Yen, Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J Cell Biol* **154**, 925-936 (2001).
36. A. De Antoni *et al.*, The Mad1/Mad2 complex as a template for Mad2 activation in the spindle assembly checkpoint. *Curr Biol* **15**, 214-225 (2005).
37. A. Kulukian, J. S. Han, D. W. Cleveland, Unattached kinetochores catalyze production of an anaphase inhibitor that requires a Mad2 template to prime Cdc20 for BubR1 binding. *Dev Cell* **16**, 105-117 (2009).

38. M. Simonetta *et al.*, The influence of catalysis on mad2 activation dynamics. *PLoS Biol* **7**, e10 (2009).
39. J. Nilsson, M. Yekezare, J. Minshull, J. Pines, The APC/C maintains the spindle assembly checkpoint by targeting Cdc20 for destruction. *Nat Cell Biol* **10**, 1411-1420 (2008).
40. N. London, S. Ceto, J. A. Ranish, S. Biggins, Phosphoregulation of Spc105 by Mps1 and PP1 regulates Bub1 localization to kinetochores. *Curr Biol* **22**, 900-906 (2012).
41. M. Vleugel, E. Hoogendoorn, B. Snel, G. J. Kops, Evolution and function of the mitotic checkpoint. *Dev Cell* **23**, 239-250 (2012).
42. S. Santaguida, A. Tighe, A. M. D'Alise, S. S. Taylor, A. Musacchio, Dissecting the role of MPS1 in chromosome biorientation and the spindle checkpoint through the small molecule inhibitor reversine. *J Cell Biol* **190**, 73-87 (2010).
43. J. M. Kasuboski *et al.*, Zwint-1 is a novel Aurora B substrate required for the assembly of a dynein-binding platform on kinetochores. *Mol Biol Cell* **22**, 3318-3330 (2011).
44. N. London, S. Biggins, Mad1 kinetochore recruitment by Mps1-mediated phosphorylation of Bub1 signals the spindle checkpoint. *Genes Dev* **28**, 140-152 (2014).
45. J. S. Rosenberg, F. R. Cross, H. Funabiki, KNL1/Spc105 recruits PP1 to silence the spindle assembly checkpoint. *Curr Biol* **21**, 942-947 (2011).
46. D. Liu *et al.*, Regulated targeting of protein phosphatase 1 to the outer kinetochore by KNL1 opposes Aurora B kinase. *J Cell Biol* **188**, 809-820 (2010).
47. B. A. Pinsky, C. R. Nelson, S. Biggins, Protein phosphatase 1 regulates exit from the spindle checkpoint in budding yeast. *Curr Biol* **19**, 1182-1187 (2009).
48. V. Vanoosthuyse, K. G. Hardwick, A novel protein phosphatase 1-dependent spindle checkpoint silencing mechanism. *Curr Biol* **19**, 1176-1181 (2009).

Bibliografia

49. A. Espert *et al.*, PP2A-B56 opposes Mps1 phosphorylation of Knl1 and thereby promotes spindle assembly checkpoint silencing. *J Cell Biol* **206**, 833-842 (2014).
50. E. A. Foley, M. Maldonado, T. M. Kapoor, Formation of stable attachments between kinetochores and microtubules depends on the B56-PP2A phosphatase. *Nat Cell Biol* **13**, 1265-1271 (2011).
51. T. Kruse *et al.*, Direct binding between BubR1 and B56-PP2A phosphatase complexes regulate mitotic progression. *J Cell Sci* **126**, 1086-1092 (2013).
52. S. J. Suijkerbuijk, M. Vleugel, A. Teixeira, G. J. Kops, Integration of kinase and phosphatase activities by BUBR1 ensures formation of stable kinetochore-microtubule attachments. *Dev Cell* **23**, 745-755 (2012).
53. B. J. Howell *et al.*, Cytoplasmic dynein/dynactin drives kinetochore protein transport to the spindle poles and has a role in mitotic spindle checkpoint inactivation. *J Cell Biol* **155**, 1159-1172 (2001).
54. R. Gassmann *et al.*, Removal of Spindly from microtubule-attached kinetochores controls spindle checkpoint silencing in human cells. *Genes Dev* **24**, 957-971 (2010).
55. J. K. Famulski, L. J. Vos, J. B. Rattner, G. K. Chan, Dynein/Dynactin-mediated transport of kinetochore components off kinetochores and onto spindle poles induced by nordihydroguaiaretic acid. *PLoS One* **6**, e16494 (2011).
56. P. M. Silva *et al.*, Dynein-dependent transport of spindle assembly checkpoint proteins off kinetochores toward spindle poles. *FEBS Lett* **588**, 3265-3273 (2014).
57. C. Sacristan, G. J. Kops, Joined at the hip: kinetochores, microtubules, and spindle assembly checkpoint signaling. *Trends Cell Biol* **25**, 21-28 (2015).
58. G. J. Kops, J. V. Shah, Connecting up and clearing out: how kinetochore attachment silences the spindle assembly checkpoint. *Chromosoma* **121**, 509-525 (2012).
59. N. Jelluma, T. B. Dansen, T. Sliedrecht, N. P. Kwiatkowski, G. J. Kops, Release of Mps1 from kinetochores is crucial for timely anaphase onset. *J Cell Biol* **191**, 281-290 (2010).

60. X. Luo, H. Yu, Protein metamorphosis: the two-state behavior of Mad2. *Structure* **16**, 1616-1625 (2008).
61. S. K. Reddy, M. Rape, W. A. Margansky, M. W. Kirschner, Ubiquitination by the anaphase-promoting complex drives spindle checkpoint inactivation. *Nature* **446**, 921-925 (2007).
62. G. Xia *et al.*, Conformation-specific binding of p31(comet) antagonizes the function of Mad2 in the spindle checkpoint. *EMBO J* **23**, 3133-3143 (2004).
63. F. Stegmeier *et al.*, Anaphase initiation is regulated by antagonistic ubiquitination and deubiquitination activities. *Nature* **446**, 876-881 (2007).
64. V. B. Indjeian, A. W. Murray, Budding yeast mitotic chromosomes have an intrinsic bias to biorient on the spindle. *Curr Biol* **17**, 1837-1846 (2007).
65. J. Loncarek *et al.*, The centromere geometry essential for keeping mitosis error free is controlled by spindle forces. *Nature* **450**, 745-749 (2007).
66. J. G. Ault, C. L. Rieder, Chromosome mal-orientation and reorientation during mitosis. *Cell Motil Cytoskeleton* **22**, 155-159 (1992).
67. D. Cimini *et al.*, Merotelic kinetochore orientation is a major mechanism of aneuploidy in mitotic mammalian tissue cells. *J Cell Biol* **153**, 517-527 (2001).
68. M. A. Lampson, I. M. Cheeseman, Sensing centromere tension: Aurora B and the regulation of kinetochore function. *Trends Cell Biol* **21**, 133-140 (2011).
69. R. B. Nicklas, How cells get the right chromosomes. *Science* **275**, 632-637 (1997).
70. T. U. Tanaka *et al.*, Evidence that the Ipl1-Sli15 (Aurora kinase-INCENP) complex promotes chromosome bi-orientation by altering kinetochore-spindle pole connections. *Cell* **108**, 317-329 (2002).
71. S. Biggins *et al.*, The conserved protein kinase Ipl1 regulates microtubule binding to kinetochores in budding yeast. *Genes Dev* **13**, 532-544 (1999).
72. S. Hauf *et al.*, The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol* **161**, 281-294 (2003).

Bibliografia

73. M. A. Lampson, K. Renduchitala, A. Khodjakov, T. M. Kapoor, Correcting improper chromosome-spindle attachments during cell division. *Nat Cell Biol* **6**, 232-237 (2004).
74. D. Liu, G. Vader, M. J. Vromans, M. A. Lampson, S. M. Lens, Sensing chromosome bi-orientation by spatial separation of aurora B kinase from kinetochore substrates. *Science* **323**, 1350-1353 (2009).
75. S. Ruchaud, M. Carmena, W. C. Earnshaw, Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 798-812 (2007).
76. M. Carmena, M. Wheelock, H. Funabiki, W. C. Earnshaw, The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 789-803 (2012).
77. V. Krenn, A. Musacchio, The Aurora B Kinase in Chromosome Bi-Orientation and Spindle Checkpoint Signaling. *Front Oncol* **5**, 225 (2015).
78. Y. Nakajima *et al.*, Nbl1p: a Borealin/Dasra/CSC-1-like protein essential for Aurora/Ipl1 complex function and integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **20**, 1772-1784 (2009).
79. A. Cormier, D. G. Drubin, G. Barnes, Phosphorylation regulates kinase and microtubule binding activities of the budding yeast chromosomal passenger complex in vitro. *J Biol Chem* **288**, 23203-23211 (2013).
80. R. Giet, C. Petretti, C. Prigent, Aurora kinases, aneuploidy and cancer, a coincidence or a real link? *Trends Cell Biol* **15**, 241-250 (2005).
81. M. Carmena, W. C. Earnshaw, The cellular geography of aurora kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 842-854 (2003).
82. D. M. Glover, M. H. Leibowitz, D. A. McLean, H. Parry, Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell* **81**, 95-105 (1995).
83. M. Carmena, S. Ruchaud, W. C. Earnshaw, Making the Auroras glow: regulation of Aurora A and B kinase function by interacting proteins. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 796-805 (2009).
84. K. Sasai *et al.*, Aurora-C kinase is a novel chromosomal passenger protein that can complement Aurora-B kinase function in mitotic cells. *Cell Motil Cytoskeleton* **59**, 249-263 (2004).

85. F. Sessa *et al.*, Mechanism of Aurora B activation by INCENP and inhibition by hesperadin. *Mol Cell* **18**, 379-391 (2005).
86. J. D. Bishop, J. M. Schumacher, Phosphorylation of the carboxyl terminus of inner centromere protein (INCENP) by the Aurora B Kinase stimulates Aurora B kinase activity. *J Biol Chem* **277**, 27577-27580 (2002).
87. R. Bayliss, A. Fry, T. Haq, S. Yeoh, On the molecular mechanisms of mitotic kinase activation. *Open Biol* **2**, 120136 (2012).
88. A. E. Kelly, H. Funabiki, Correcting aberrant kinetochore microtubule attachments: an Aurora B-centric view. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 51-58 (2009).
89. N. Jelluma *et al.*, Mps1 phosphorylates Borealin to control Aurora B activity and chromosome alignment. *Cell* **132**, 233-246 (2008).
90. G. Vader, S. M. Lens, The Aurora kinase family in cell division and cancer. *Biochim Biophys Acta* **1786**, 60-72 (2008).
91. P. R. Andreassen, D. K. Palmer, M. H. Wener, R. L. Margolis, Telophase disc: a new mammalian mitotic organelle that bisects telophase cells with a possible function in cytokinesis. *J Cell Sci* **99** (Pt 3), 523-534 (1991).
92. S. Martineau-Thuillier, P. R. Andreassen, R. L. Margolis, Colocalization of TD-60 and INCENP throughout G2 and mitosis: evidence for their possible interaction in signalling cytokinesis. *Chromosoma* **107**, 461-470 (1998).
93. S. E. Rosasco-Nitcher, W. Lan, S. Khorasanizadeh, P. T. Stukenberg, Centromeric Aurora-B activation requires TD-60, microtubules, and substrate priming phosphorylation. *Science* **319**, 469-472 (2008).
94. R. Gassmann *et al.*, Borealin: a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle. *J Cell Biol* **166**, 179-191 (2004).
95. Y. Wang, F. Jin, R. Higgins, K. McKnight, The current view for the silencing of the spindle assembly checkpoint. *Cell Cycle* **13**, 1694-1701 (2014).
96. C. A. Cooke, M. M. Heck, W. C. Earnshaw, The inner centromere protein (INCENP) antigens: movement from inner centromere to midbody during mitosis. *J Cell Biol* **105**, 2053-2067 (1987).
97. C. K. Hu, M. Coughlin, T. J. Mitchison, Midbody assembly and its regulation during cytokinesis. *Mol Biol Cell* **23**, 1024-1034 (2012).

Bibliografia

98. U. R. Klein, E. A. Nigg, U. Gruneberg, Centromere targeting of the chromosomal passenger complex requires a ternary subcomplex of Borealin, Survivin, and the N-terminal domain of INCENP. *Mol Biol Cell* **17**, 2547-2558 (2006).
99. M. A. Hickman, C. A. Froyd, L. N. Rusche, Reinventing heterochromatin in budding yeasts: Sir2 and the origin recognition complex take center stage. *Eukaryot Cell* **10**, 1183-1192 (2011).
100. A. van der Horst, S. M. Lens, Cell division: control of the chromosomal passenger complex in time and space. *Chromosoma* **123**, 25-42 (2014).
101. M. Carmena, W. C. Earnshaw, INCENP at the kinase crossroads. *Nat Cell Biol* **8**, 110-111 (2006).
102. H. Goto *et al.*, Complex formation of Plk1 and INCENP required for metaphase-anaphase transition. *Nat Cell Biol* **8**, 180-187 (2006).
103. S. Hummer, T. U. Mayer, Cdk1 negatively regulates midzone localization of the mitotic kinesin Mklp2 and the chromosomal passenger complex. *Curr Biol* **19**, 607-612 (2009).
104. Y. Nakajima *et al.*, Ipl1/Aurora-dependent phosphorylation of Sli15/INCENP regulates CPC-spindle interaction to ensure proper microtubule dynamics. *J Cell Biol* **194**, 137-153 (2011).
105. G. Pereira, E. Schiebel, Separase regulates INCENP-Aurora B anaphase spindle function through Cdc14. *Science* **302**, 2120-2124 (2003).
106. M. D. Vazquez-Novelle, M. Petronczki, Relocation of the chromosomal passenger complex prevents mitotic checkpoint engagement at anaphase. *Curr Biol* **20**, 1402-1407 (2010).
107. L. Mirchenko, F. Uhlmann, Sli15(INCENP) dephosphorylation prevents mitotic checkpoint reengagement due to loss of tension at anaphase onset. *Curr Biol* **20**, 1396-1401 (2010).
108. G. Ambrosini, C. Adida, D. C. Altieri, A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* **3**, 917-921 (1997).
109. R. H. Stauber *et al.*, Nucleocytoplasmic shuttling and the biological activity of mouse survivin are regulated by an active nuclear export signal. *Traffic* **7**, 1461-1472 (2006).

110. C. M. Connell, R. Colnaghi, S. P. Wheatley, Nuclear survivin has reduced stability and is not cytoprotective. *J Biol Chem* **283**, 3289-3296 (2008).
111. P. O. Widlund *et al.*, Phosphorylation of the chromosomal passenger protein Bir1 is required for localization of Ndc10 to the spindle during anaphase and full spindle elongation. *Mol Biol Cell* **17**, 1065-1074 (2006).
112. A. A. Jeyaprakash *et al.*, Structure of a Survivin-Borealin-INCENP core complex reveals how chromosomal passengers travel together. *Cell* **131**, 271-285 (2007).
113. W. C. Earnshaw, R. L. Bernat, Chromosomal passengers: toward an integrated view of mitosis. *Chromosoma* **100**, 139-146 (1991).
114. G. Vader, R. H. Medema, S. M. Lens, The chromosomal passenger complex: guiding Aurora-B through mitosis. *J Cell Biol* **173**, 833-837 (2006).
115. M. Glotzer, The 3Ms of central spindle assembly: microtubules, motors and MAPs. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 9-20 (2009).
116. O. Afonso, A. C. Figueiredo, H. Maiato, Late mitotic functions of Aurora kinases. *Chromosoma*, (2016).
117. P. P. D'Avino, L. Capalbo, New Auroras on the Roles of the Chromosomal Passenger Complex in Cytokinesis: Implications for Cancer Therapies. *Front Oncol* **5**, 221 (2015).
118. Y. Yamagishi, T. Honda, Y. Tanno, Y. Watanabe, Two histone marks establish the inner centromere and chromosome bi-orientation. *Science* **330**, 239-243 (2010).
119. M. E. Bekier, T. Mazur, M. S. Rashid, W. R. Taylor, Borealin dimerization mediates optimal CPC checkpoint function by enhancing localization to centromeres and kinetochores. *Nat Commun* **6**, 6775 (2015).
120. M. S. van der Waal *et al.*, Mps1 promotes rapid centromere accumulation of Aurora B. *EMBO Rep* **13**, 847-854 (2012).
121. H. Kaur, M. E. Bekier, W. R. Taylor, Regulation of Borealin by phosphorylation at serine 219. *J Cell Biochem* **111**, 1291-1298 (2010).

Bibliografia

122. K. Peplowska, A. U. Wallek, Z. Storchova, Sgo1 regulates both condensin and Ipl1/Aurora B to promote chromosome biorientation. *PLoS Genet* **10**, e1004411 (2014).
123. J. Qian, B. Lesage, M. Beullens, A. Van Eynde, M. Bollen, PP1/Repo-man dephosphorylates mitotic histone H3 at T3 and regulates chromosomal aurora B targeting. *Curr Biol* **21**, 766-773 (2011).
124. F. Wang *et al.*, Histone H3 Thr-3 phosphorylation by Haspin positions Aurora B at centromeres in mitosis. *Science* **330**, 231-235 (2010).
125. H. Edgerton *et al.*, A noncatalytic function of the topoisomerase II CTD in Aurora B recruitment to inner centromeres during mitosis. *J Cell Biol* **213**, 651-664 (2016).
126. U. S. Cho, S. C. Harrison, Ndc10 is a platform for inner kinetochore assembly in budding yeast. *Nat Struct Mol Biol* **19**, 48-55 (2012).
127. H. J. Yoon, J. Carbon, Participation of Bir1p, a member of the inhibitor of apoptosis family, in yeast chromosome segregation events. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13208-13213 (1999).
128. K. K. Sarangapani, C. L. Asbury, Catch and release: how do kinetochores hook the right microtubules during mitosis? *Trends Genet* **30**, 150-159 (2014).
129. S. M. Lens, E. E. Voest, R. H. Medema, Shared and separate functions of polo-like kinases and aurora kinases in cancer. *Nat Rev Cancer* **10**, 825-841 (2010).
130. J. P. Welburn *et al.*, Aurora B phosphorylates spatially distinct targets to differentially regulate the kinetochore-microtubule interface. *Mol Cell* **38**, 383-392 (2010).
131. I. M. Cheeseman *et al.*, Phospho-regulation of kinetochore-microtubule attachments by the Aurora kinase Ipl1p. *Cell* **111**, 163-172 (2002).
132. J. F. Maure *et al.*, The Ndc80 loop region facilitates formation of kinetochore attachment to the dynamic microtubule plus end. *Curr Biol* **21**, 207-213 (2011).
133. D. R. Gestaut *et al.*, Phosphoregulation and depolymerization-driven movement of the Dam1 complex do not require ring formation. *Nat Cell Biol* **10**, 407-414 (2008).

134. C. Shang *et al.*, Kinetochore protein interactions and their regulation by the Aurora kinase Ipl1p. *Mol Biol Cell* **14**, 3342-3355 (2003).
135. J. F. Tien *et al.*, Cooperation of the Dam1 and Ndc80 kinetochore complexes enhances microtubule coupling and is regulated by aurora B. *J Cell Biol* **189**, 713-723 (2010).
136. F. Lampert, P. Hornung, S. Westermann, The Dam1 complex confers microtubule plus end-tracking activity to the Ndc80 kinetochore complex. *J Cell Biol* **189**, 641-649 (2010).
137. J. P. Welburn *et al.*, The human kinetochore Ska1 complex facilitates microtubule depolymerization-coupled motility. *Dev Cell* **16**, 374-385 (2009).
138. A. Hanisch, H. H. Sillje, E. A. Nigg, Timely anaphase onset requires a novel spindle and kinetochore complex comprising Ska1 and Ska2. *EMBO J* **25**, 5504-5515 (2006).
139. Y. W. Chan, A. A. Jeyaprakash, E. A. Nigg, A. Santamaria, Aurora B controls kinetochore-microtubule attachments by inhibiting Ska complex-KMN network interaction. *J Cell Biol* **196**, 563-571 (2012).
140. S. Sivakumar *et al.*, The human SKA complex drives the metaphase-anaphase cell cycle transition by recruiting protein phosphatase 1 to kinetochores. *Elife* **5**, (2016).
141. G. J. Gorbsky, Mitosis: MCAK under the aura of Aurora B. *Curr Biol* **14**, R346-348 (2004).
142. A. L. Knowlton, V. V. Vorozhko, W. Lan, G. J. Gorbsky, P. T. Stukenberg, ICIS and Aurora B coregulate the microtubule depolymerase Kif2a. *Curr Biol* **19**, 758-763 (2009).
143. M. A. Lampson, T. M. Kapoor, The human mitotic checkpoint protein BubR1 regulates chromosome-spindle attachments. *Nat Cell Biol* **7**, 93-98 (2005).
144. G. V. Caldas, K. F. DeLuca, J. G. DeLuca, KNL1 facilitates phosphorylation of outer kinetochore proteins by promoting Aurora B kinase activity. *J Cell Biol* **203**, 957-969 (2013).
145. G. V. Caldas, J. G. DeLuca, KNL1: bringing order to the kinetochore. *Chromosoma* **123**, 169-181 (2014).

146. D. Liu, M. A. Lampson, Regulation of kinetochore-microtubule attachments by Aurora B kinase. *Biochem Soc Trans* **37**, 976-980 (2009).
147. W. Antonin, H. Neumann, Chromosome condensation and decondensation during mitosis. *Curr Opin Cell Biol* **40**, 15-22 (2016).
148. S. Abe *et al.*, The initial phase of chromosome condensation requires Cdk1-mediated phosphorylation of the CAP-D3 subunit of condensin II. *Genes Dev* **25**, 863-874 (2011).
149. H. Meyer, A. Drozdowska, G. Dobrynin, A role for Cdc48/p97 and Aurora B in controlling chromatin condensation during exit from mitosis. *Biochem Cell Biol* **88**, 23-28 (2010).
150. J. Y. Hsu *et al.*, Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell* **102**, 279-291 (2000).
151. A. E. de la Barre, D. Angelov, A. Molla, S. Dimitrov, The N-terminus of histone H2B, but not that of histone H3 or its phosphorylation, is essential for chromosome condensation. *EMBO J* **20**, 6383-6393 (2001).
152. J. M. Higgins, L. Prendergast, Mitotic Mysteries: The Case of HP1. *Dev Cell* **36**, 477-478 (2016).
153. X. Liu *et al.*, Chromatin protein HP1 interacts with the mitotic regulator borealin protein and specifies the centromere localization of the chromosomal passenger complex. *J Biol Chem* **289**, 20638-20649 (2014).
154. T. Hirano, Condensins: universal organizers of chromosomes with diverse functions. *Genes Dev* **26**, 1659-1678 (2012).
155. M. Kitagawa, S. H. Lee, The chromosomal passenger complex (CPC) as a key orchestrator of orderly mitotic exit and cytokinesis. *Front Cell Dev Biol* **3**, 14 (2015).
156. K. Ramadan *et al.*, Cdc48/p97 promotes reformation of the nucleus by extracting the kinase Aurora B from chromatin. *Nature* **450**, 1258-1262 (2007).
157. B. G. Fuller *et al.*, Midzone activation of aurora B in anaphase produces an intracellular phosphorylation gradient. *Nature* **453**, 1132-1136 (2008).

158. L. Trinkle-Mulcahy, A. I. Lamond, Mitotic phosphatases: no longer silent partners. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 623-631 (2006).
159. M. E. Murnion *et al.*, Chromatin-associated protein phosphatase 1 regulates aurora-B and histone H3 phosphorylation. *J Biol Chem* **276**, 26656-26665 (2001).
160. P. Vagnarelli *et al.*, Condensin and Repo-Man-PP1 co-operate in the regulation of chromosome architecture during mitosis. *Nat Cell Biol* **8**, 1133-1142 (2006).
161. E. Varela, K. Shimada, T. Laroche, D. Leroy, S. M. Gasser, Lte1, Cdc14 and MEN-controlled Cdk inactivation in yeast coordinate rDNA decompaction with late telophase progression. *EMBO J* **28**, 1562-1575 (2009).
162. H. G. Nguyen, D. Chinnappan, T. Urano, K. Ravid, Mechanism of Aurora-B degradation and its dependency on intact KEN and A-boxes: identification of an aneuploidy-promoting property. *Mol Cell Biol* **25**, 4977-4992 (2005).
163. S. Stewart, G. Fang, Destruction box-dependent degradation of aurora B is mediated by the anaphase-promoting complex/cyclosome and Cdh1. *Cancer Res* **65**, 8730-8735 (2005).
164. H. Meyer, M. Bug, S. Bremer, Emerging functions of the VCP/p97 AAA-ATPase in the ubiquitin system. *Nat Cell Biol* **14**, 117-123 (2012).
165. I. Sumara *et al.*, A Cul3-based E3 ligase removes Aurora B from mitotic chromosomes, regulating mitotic progression and completion of cytokinesis in human cells. *Dev Cell* **12**, 887-900 (2007).
166. Y. Ye, Diverse functions with a common regulator: ubiquitin takes command of an AAA ATPase. *J Struct Biol* **156**, 29-40 (2006).
167. G. Dobrynin *et al.*, Cdc48/p97-Ufd1-Npl4 antagonizes Aurora B during chromosome segregation in HeLa cells. *J Cell Sci* **124**, 1571-1580 (2011).
168. S. Bohm, A. Buchberger, The budding yeast Cdc48(Shp1) complex promotes cell cycle progression by positive regulation of protein phosphatase 1 (Glc7). *PLoS One* **8**, e56486 (2013).
169. U. Gruneberg, R. Neef, R. Honda, E. A. Nigg, F. A. Barr, Relocation of Aurora B from centromeres to the central spindle at the metaphase to anaphase transition requires MKlp2. *J Cell Biol* **166**, 167-172 (2004).

170. A. M. Mackay, A. M. Ainsztein, D. M. Eckley, W. C. Earnshaw, A dominant mutant of inner centromere protein (INCENP), a chromosomal protein, disrupts prometaphase congression and cytokinesis. *J Cell Biol* **140**, 991-1002 (1998).
171. M. S. van der Waal, R. C. Hengeveld, A. van der Horst, S. M. Lens, Cell division control by the Chromosomal Passenger Complex. *Exp Cell Res* **318**, 1407-1420 (2012).
172. T. Zimniak *et al.*, Spatiotemporal regulation of Ipl1/Aurora activity by direct Cdk1 phosphorylation. *Curr Biol* **22**, 787-793 (2012).
173. R. Uehara *et al.*, Aurora B and Kif2A control microtubule length for assembly of a functional central spindle during anaphase. *J Cell Biol* **202**, 623-636 (2013).
174. P. Bieling, I. A. Telley, T. Surrey, A minimal midzone protein module controls formation and length of antiparallel microtubule overlaps. *Cell* **142**, 420-432 (2010).
175. Y. Kurasawa, W. C. Earnshaw, Y. Mochizuki, N. Dohmae, K. Todokoro, Essential roles of KIF4 and its binding partner PRC1 in organized central spindle midzone formation. *EMBO J* **23**, 3237-3248 (2004).
176. R. Subramanian *et al.*, Insights into antiparallel microtubule crosslinking by PRC1, a conserved nonmotor microtubule binding protein. *Cell* **142**, 433-443 (2010).
177. C. Zhu, W. Jiang, Cell cycle-dependent translocation of PRC1 on the spindle by Kif4 is essential for midzone formation and cytokinesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 343-348 (2005).
178. C. Zhu, E. Lau, R. Schwarzenbacher, E. Bossy-Wetzel, W. Jiang, Spatiotemporal control of spindle midzone formation by PRC1 in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 6196-6201 (2006).
179. R. Nunes Bastos *et al.*, Aurora B suppresses microtubule dynamics and limits central spindle size by locally activating KIF4A. *J Cell Biol* **202**, 605-621 (2013).
180. R. N. Bastos, M. J. Cundell, F. A. Barr, KIF4A and PP2A-B56 form a spatially restricted feedback loop opposing Aurora B at the anaphase central spindle. *J Cell Biol* **207**, 683-693 (2014).

181. S. C. Schuyler, J. Y. Liu, D. Pellman, The molecular function of Ase1p: evidence for a MAP-dependent midzone-specific spindle matrix. Microtubule-associated proteins. *J Cell Biol* **160**, 517-528 (2003).
182. R. A. Green, E. Paluch, K. Oegema, Cytokinesis in animal cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* **28**, 29-58 (2012).
183. M. Mishima, S. Kaitna, M. Glotzer, Central spindle assembly and cytokinesis require a kinesin-like protein/RhoGAP complex with microtubule bundling activity. *Dev Cell* **2**, 41-54 (2002).
184. M. E. Douglas, M. Mishima, Still entangled: assembly of the central spindle by multiple microtubule modulators. *Semin Cell Dev Biol* **21**, 899-908 (2010).
185. M. E. Douglas, T. Davies, N. Joseph, M. Mishima, Aurora B and 14-3-3 coordinately regulate clustering of centralspindlin during cytokinesis. *Curr Biol* **20**, 927-933 (2010).
186. K. Burridge, K. Wennerberg, Rho and Rac take center stage. *Cell* **116**, 167-179 (2004).
187. O. Yuce, A. Piekny, M. Glotzer, An ECT2-centralspindlin complex regulates the localization and function of RhoA. *J Cell Biol* **170**, 571-582 (2005).
188. Y. Nishimura, S. Yonemura, Centralspindlin regulates ECT2 and RhoA accumulation at the equatorial cortex during cytokinesis. *J Cell Sci* **119**, 104-114 (2006).
189. K. C. Su, T. Takaki, M. Petronczki, Targeting of the RhoGEF Ect2 to the equatorial membrane controls cleavage furrow formation during cytokinesis. *Dev Cell* **21**, 1104-1115 (2011).
190. M. Petronczki, M. Glotzer, N. Kraut, J. M. Peters, Polo-like kinase 1 triggers the initiation of cytokinesis in human cells by promoting recruitment of the RhoGEF Ect2 to the central spindle. *Dev Cell* **12**, 713-725 (2007).
191. Y. Minoshima *et al.*, Phosphorylation by aurora B converts MgcRacGAP to a RhoGAP during cytokinesis. *Dev Cell* **4**, 549-560 (2003).
192. A. Piekny, M. Werner, M. Glotzer, Cytokinesis: welcome to the Rho zone. *Trends Cell Biol* **15**, 651-658 (2005).

Bibliografia

193. C. McKenzie *et al.*, Cross-regulation between Aurora B and Citron kinase controls midbody architecture in cytokinesis. *Open Biol* **6**, (2016).
194. N. Ozlu *et al.*, Binding partner switching on microtubules and aurora-B in the mitosis to cytokinesis transition. *Mol Cell Proteomics* **9**, 336-350 (2010).
195. B. I. Gerashchenko, M. Murata-Hori, H. Hosoya, Myosin regulatory light chain as a critical substrate of cell death: a hypothesis. *Med Hypotheses* **54**, 850-852 (2000).
196. M. Murata-Hori *et al.*, Myosin II regulatory light chain as a novel substrate for AIM-1, an aurora/Ipl1p-related kinase from rat. *J Biochem* **128**, 903-907 (2000).
197. S. L. Sanders, C. M. Field, Cell division. Septins in common? *Curr Biol* **4**, 907-910 (1994).
198. M. Qi *et al.*, Septin1, a new interaction partner for human serine/threonine kinase aurora-B. *Biochem Biophys Res Commun* **336**, 994-1000 (2005).
199. H. Goto *et al.*, Aurora-B regulates the cleavage furrow-specific vimentin phosphorylation in the cytokinetic process. *J Biol Chem* **278**, 8526-8530 (2003).
200. R. Heald, F. McKeon, Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis. *Cell* **61**, 579-589 (1990).
201. A. F. Straight *et al.*, Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II Inhibitor. *Science* **299**, 1743-1747 (2003).
202. J. Landino, R. Ohi, The Timing of Midzone Stabilization during Cytokinesis Depends on Myosin II Activity and an Interaction between INCENP and Actin. *Curr Biol* **26**, 698-706 (2016).
203. A. Janssen, M. van der Burg, K. Szuhai, G. J. Kops, R. H. Medema, Chromosome segregation errors as a cause of DNA damage and structural chromosome aberrations. *Science* **333**, 1895-1898 (2011).
204. Q. Shi, R. W. King, Chromosome nondisjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines. *Nature* **437**, 1038-1042 (2005).
205. T. Fujiwara *et al.*, Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. *Nature* **437**, 1043-1047 (2005).

206. M. Agromayor, J. Martin-Serrano, Knowing when to cut and run: mechanisms that control cytokinetic abscission. *Trends Cell Biol* **23**, 433-441 (2013).
207. D. Cimini, M. Mattiuzzo, L. Torosantucci, F. Degrassi, Histone hyperacetylation in mitosis prevents sister chromatid separation and produces chromosome segregation defects. *Mol Biol Cell* **14**, 3821-3833 (2003).
208. D. Gisselsson *et al.*, Chromosomal breakage-fusion-bridge events cause genetic intratumor heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5357-5362 (2000).
209. N. J. Ganem, Z. Storchova, D. Pellman, Tetraploidy, aneuploidy and cancer. *Curr Opin Genet Dev* **17**, 157-162 (2007).
210. K. Chin *et al.*, In situ analyses of genome instability in breast cancer. *Nat Genet* **36**, 984-988 (2004).
211. R. S. Maser, R. A. DePinho, Connecting chromosomes, crisis, and cancer. *Science* **297**, 565-569 (2002).
212. Y. Stewenius *et al.*, Structural and numerical chromosome changes in colon cancer develop through telomere-mediated anaphase bridges, not through mitotic multipolarity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 5541-5546 (2005).
213. C. Norden *et al.*, The NoCut pathway links completion of cytokinesis to spindle midzone function to prevent chromosome breakage. *Cell* **125**, 85-98 (2006).
214. N. Amaral *et al.*, The Aurora-B-dependent NoCut checkpoint prevents damage of anaphase bridges after DNA replication stress. *Nat Cell Biol* **18**, 516-526 (2016).
215. M. Mendoza *et al.*, A mechanism for chromosome segregation sensing by the NoCut checkpoint. *Nat Cell Biol* **11**, 477-483 (2009).
216. P. Steigemann *et al.*, Aurora B-mediated abscission checkpoint protects against tetraploidization. *Cell* **136**, 473-484 (2009).
217. J. G. Carlton, A. Caballe, M. Agromayor, M. Kloc, J. Martin-Serrano, ESCRT-III governs the Aurora B-mediated abscission checkpoint through CHMP4C. *Science* **336**, 220-225 (2012).

218. L. Capalbo *et al.*, The chromosomal passenger complex controls the function of endosomal sorting complex required for transport-III Snf7 proteins during cytokinesis. *Open Biol* **2**, 120070 (2012).
219. S. B. Thoresen *et al.*, ANCHR mediates Aurora-B-dependent abscission checkpoint control through retention of VPS4. *Nat Cell Biol* **16**, 550-560 (2014).
220. V. Bavetsias, S. Linardopoulos, Aurora Kinase Inhibitors: Current Status and Outlook. *Front Oncol* **5**, 278 (2015).
221. A. Ewart-Toland *et al.*, Aurora-A/STK15 T+91A is a general low penetrance cancer susceptibility gene: a meta-analysis of multiple cancer types. *Carcinogenesis* **26**, 1368-1373 (2005).
222. W. F. Zeng, K. Navaratne, R. A. Prayson, R. J. Weil, Aurora B expression correlates with aggressive behaviour in glioblastoma multiforme. *J Clin Pathol* **60**, 218-221 (2007).
223. B. Vischioni, J. J. Oudejans, W. Vos, J. A. Rodriguez, G. Giaccone, Frequent overexpression of aurora B kinase, a novel drug target, in non-small cell lung carcinoma patients. *Mol Cancer Ther* **5**, 2905-2913 (2006).
224. F. Lopez-Rios *et al.*, Global gene expression profiling of pleural mesotheliomas: overexpression of aurora kinases and P16/CDKN2A deletion as prognostic factors and critical evaluation of microarray-based prognostic prediction. *Cancer Res* **66**, 2970-2979 (2006).
225. G. Qi *et al.*, Aurora-B expression and its correlation with cell proliferation and metastasis in oral cancer. *Virchows Arch* **450**, 297-302 (2007).
226. M. Yasen *et al.*, Expression of Aurora B and alternative variant forms in hepatocellular carcinoma and adjacent tissue. *Cancer Sci* **100**, 472-480 (2009).
227. P. Chieffi *et al.*, Aurora B expression in normal testis and seminomas. *J Endocrinol* **181**, 263-270 (2004).
228. F. Esposito *et al.*, Aurora B expression in post-puberal testicular germ cell tumours. *J Cell Physiol* **221**, 435-439 (2009).

- 229. Y. J. Chen *et al.*, Overexpression of Aurora B is associated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer patients. *Virchows Arch* **455**, 431-440 (2009).
- 230. R. Sorrentino *et al.*, Aurora B overexpression associates with the thyroid carcinoma undifferentiated phenotype and is required for thyroid carcinoma cell proliferation. *J Clin Endocrinol Metab* **90**, 928-935 (2005).
- 231. M. Tatsuka *et al.*, Multinuclearity and increased ploidy caused by overexpression of the aurora- and Ipl1-like midbody-associated protein mitotic kinase in human cancer cells. *Cancer Res* **58**, 4811-4816 (1998).
- 232. A. Pohl *et al.*, Pharmacogenetic profiling of Aurora kinase B is associated with overall survival in metastatic colorectal cancer. *Pharmacogenomics J* **11**, 93-99 (2011).
- 233. P. Chieffi *et al.*, Aurora B expression directly correlates with prostate cancer malignancy and influence prostate cell proliferation. *Prostate* **66**, 326-333 (2006).
- 234. P. Carpinelli, J. Moll, Aurora kinase inhibitors: identification and preclinical validation of their biomarkers. *Expert Opin Ther Targets* **12**, 69-80 (2008).
- 235. C. H. Cheung, M. S. Coumar, H. P. Hsieh, J. Y. Chang, Aurora kinase inhibitors in preclinical and clinical testing. *Expert Opin Investig Drugs* **18**, 379-398 (2009).
- 236. G. Portella, C. Passaro, P. Chieffi, Aurora B: a new prognostic marker and therapeutic target in cancer. *Curr Med Chem* **18**, 482-496 (2011).
- 237. P. D. Andrews, Aurora kinases: shining lights on the therapeutic horizon? *Oncogene* **24**, 5005-5015 (2005).
- 238. K. E. Gascoigne, S. S. Taylor, How do anti-mitotic drugs kill cancer cells? *J Cell Sci* **122**, 2579-2585 (2009).
- 239. M. A. Jordan, L. Wilson, Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* **4**, 253-265 (2004).
- 240. R. J. van Vuuren, M. H. Visagie, A. E. Theron, A. M. Joubert, Antimitotic drugs in the treatment of cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* **76**, 1101-1112 (2015).

Bibliografia

241. L. M. Zasadil *et al.*, Cytotoxicity of paclitaxel in breast cancer is due to chromosome missegregation on multipolar spindles. *Sci Transl Med* **6**, 229ra243 (2014).
242. S. L. Warner *et al.*, Comparing Aurora A and Aurora B as molecular targets for growth inhibition of pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Ther* **5**, 2450-2458 (2006).
243. F. Girdler *et al.*, Validating Aurora B as an anti-cancer drug target. *J Cell Sci* **119**, 3664-3675 (2006).
244. M. Kollareddy *et al.*, Aurora kinase inhibitors: progress towards the clinic. *Invest New Drugs* **30**, 2411-2432 (2012).
245. J. F. Hilton, G. I. Shapiro, Aurora kinase inhibition as an anticancer strategy. *J Clin Oncol* **32**, 57-59 (2014).
246. J. S. Nair *et al.*, Aurora B kinase regulates the postmitotic endoreduplication checkpoint via phosphorylation of the retinoblastoma protein at serine 780. *Mol Biol Cell* **20**, 2218-2228 (2009).
247. A. A. Dar, L. W. Goff, S. Majid, J. Berlin, W. El-Rifai, Aurora kinase inhibitors--rising stars in cancer therapeutics? *Mol Cancer Ther* **9**, 268-278 (2010).
248. B. Lowenberg *et al.*, Phase 1/2 study to assess the safety, efficacy, and pharmacokinetics of barasertib (AZD1152) in patients with advanced acute myeloid leukemia. *Blood* **118**, 6030-6036 (2011).
249. D. S. Boss *et al.*, Clinical evaluation of AZD1152, an i.v. inhibitor of Aurora B kinase, in patients with solid malignant tumors. *Ann Oncol* **22**, 431-437 (2011).
250. I. Marzo, J. Naval, Antimitotic drugs in cancer chemotherapy: promises and pitfalls. *Biochem Pharmacol* **86**, 703-710 (2013).
251. A. Z. Wang, R. Langer, O. C. Farokhzad, Nanoparticle delivery of cancer drugs. *Annu Rev Med* **63**, 185-198 (2012).
252. S. Ashton *et al.*, Aurora kinase inhibitor nanoparticles target tumors with favorable therapeutic index in vivo. *Sci Transl Med* **8**, 325ra317 (2016).
253. T. U. Tanaka, Chromosome bi-orientation on the mitotic spindle. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **360**, 581-589 (2005).

254. B. A. Pinsky, C. Kung, K. M. Shokat, S. Biggins, The Ipl1-Aurora protein kinase activates the spindle checkpoint by creating unattached kinetochores. *Nat Cell Biol* **8**, 78-83 (2006).
255. K. E. Ross, O. Cohen-Fix, The role of Cdh1p in maintaining genomic stability in budding yeast. *Genetics* **165**, 489-503 (2003).
256. S. Biggins, A. W. Murray, The budding yeast protein kinase Ipl1/Aurora allows the absence of tension to activate the spindle checkpoint. *Genes Dev* **15**, 3118-3129 (2001).
257. J. Wong *et al.*, A protein interaction map of the mitotic spindle. *Mol Biol Cell* **18**, 3800-3809 (2007).
258. C. V. Kotwaliwale, S. B. Frei, B. M. Stern, S. Biggins, A pathway containing the Ipl1/aurora protein kinase and the spindle midzone protein Ase1 regulates yeast spindle assembly. *Dev Cell* **13**, 433-445 (2007).
259. F. Monje-Casas, V. R. Prabhu, B. H. Lee, M. Boselli, A. Amon, Kinetochore orientation during meiosis is controlled by Aurora B and the monopolin complex. *Cell* **128**, 477-490 (2007).
260. C. Michaelis, R. Ciosk, K. Nasmyth, Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell* **91**, 35-45 (1997).
261. R. J. Dohmen, P. Wu, A. Varshavsky, Heat-inducible degron: a method for constructing temperature-sensitive mutants. *Science* **263**, 1273-1276 (1994).
262. T. Ota *et al.*, Increased mitotic phosphorylation of histone H3 attributable to AIM-1/Aurora-B overexpression contributes to chromosome number instability. *Cancer Res* **62**, 5168-5177 (2002).
263. Y. Terada *et al.*, AIM-1: a mammalian midbody-associated protein required for cytokinesis. *EMBO J* **17**, 667-676 (1998).
264. S. L. Forsburg, P. Nurse, Cell cycle regulation in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Annu Rev Cell Biol* **7**, 227-256 (1991).
265. A. F. Straight, W. F. Marshall, J. W. Sedat, A. W. Murray, Mitosis in living budding yeast: anaphase A but no metaphase plate. *Science* **277**, 574-578 (1997).

266. E. M. King, N. Rachidi, N. Morrice, K. G. Hardwick, M. J. Stark, Ipl1p-dependent phosphorylation of Mad3p is required for the spindle checkpoint response to lack of tension at kinetochores. *Genes Dev* **21**, 1163-1168 (2007).
267. S. L. Smith *et al.*, Overexpression of aurora B kinase (AURKB) in primary non-small cell lung carcinoma is frequent, generally driven from one allele, and correlates with the level of genetic instability. *Br J Cancer* **93**, 719-729 (2005).
268. F. de Paula Careta *et al.*, The Aurora A and B kinases are up-regulated in bone marrow-derived chronic lymphocytic leukemia cells and represent potential therapeutic targets. *Haematologica* **97**, 1246-1254 (2012).
269. R. R. Adams *et al.*, Human INCENP colocalizes with the Aurora-B/AIRK2 kinase on chromosomes and is overexpressed in tumour cells. *Chromosoma* **110**, 65-74 (2001).
270. Y. Wei, C. A. Mizzen, R. G. Cook, M. A. Gorovsky, C. D. Allis, Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis in Tetrahymena. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7480-7484 (1998).
271. Y. Wei, L. Yu, J. Bowen, M. A. Gorovsky, C. D. Allis, Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell* **97**, 99-109 (1999).
272. M. J. Hendzel *et al.*, Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* **106**, 348-360 (1997).
273. C. Prigent, S. Dimitrov, Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *J Cell Sci* **116**, 3677-3685 (2003).
274. J. F. Cannon, Function of protein phosphatase-1, Glc7, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv Appl Microbiol* **73**, 27-59 (2010).
275. W. Wang, P. T. Stukenberg, D. L. Brautigan, Phosphatase inhibitor-2 balances protein phosphatase 1 and aurora B kinase for chromosome segregation and cytokinesis in human retinal epithelial cells. *Mol Biol Cell* **19**, 4852-4862 (2008).

276. I. Sassoon *et al.*, Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* kinetochores by the type 1 phosphatase Glc7p. *Genes Dev* **13**, 545-555 (1999).
277. A. Ghosh, J. F. Cannon, Analysis of protein phosphatase-1 and aurora protein kinase suppressors reveals new aspects of regulatory protein function in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* **8**, e69133 (2013).
278. F. Severin, A. A. Hyman, S. Piatti, Correct spindle elongation at the metaphase/anaphase transition is an APC-dependent event in budding yeast. *J Cell Biol* **155**, 711-718 (2001).
279. E. Wang, E. R. Ballister, M. A. Lampson, Aurora B dynamics at centromeres create a diffusion-based phosphorylation gradient. *J Cell Biol* **194**, 539-549 (2011).
280. A. D. Donaldson, J. V. Kilmartin, Spc42p: a phosphorylated component of the *S. cerevisiae* spindle pole body (SPB) with an essential function during SPB duplication. *J Cell Biol* **132**, 887-901 (1996).
281. R. M. Ricke, K. B. Jeganathan, J. M. van Deursen, Bub1 overexpression induces aneuploidy and tumor formation through Aurora B kinase hyperactivation. *J Cell Biol* **193**, 1049-1064 (2011).
282. A. M. Courtwright, X. He, Dam1 is the right one: phosphoregulation of kinetochore biorientation. *Dev Cell* **3**, 610-611 (2002).
283. P. Keating, N. Rachidi, T. U. Tanaka, M. J. Stark, Ipl1-dependent phosphorylation of Dam1 is reduced by tension applied on kinetochores. *J Cell Sci* **122**, 4375-4382 (2009).
284. W. Zachariae, K. Nasmyth, Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes Dev* **13**, 2039-2058 (1999).
285. M. Shirayama, A. Toth, M. Galova, K. Nasmyth, APC(Cdc20) promotes exit from mitosis by destroying the anaphase inhibitor Pds1 and cyclin Clb5. *Nature* **402**, 203-207 (1999).
286. R. Wasch, F. R. Cross, APC-dependent proteolysis of the mitotic cyclin Clb2 is essential for mitotic exit. *Nature* **418**, 556-562 (2002).
287. K. Nasmyth, C. H. Haering, Cohesin: its roles and mechanisms. *Annu Rev Genet* **43**, 525-558 (2009).

Bibliografia

288. J. A. Bernal *et al.*, Proliferative potential after DNA damage and non-homologous end joining are affected by loss of securin. *Cell Death Differ* **15**, 202-212 (2008).
289. A. J. Faragher *et al.*, Death receptor-induced apoptosis reveals a novel interplay between the chromosomal passenger complex and CENP-C during interphase. *Mol Biol Cell* **18**, 1337-1347 (2007).
290. R. Honda, R. Korner, E. A. Nigg, Exploring the functional interactions between Aurora B, INCENP, and survivin in mitosis. *Mol Biol Cell* **14**, 3325-3341 (2003).
291. C. Zhu, E. Bossy-Wetzel, W. Jiang, Recruitment of MKLP1 to the spindle midzone/midbody by INCENP is essential for midbody formation and completion of cytokinesis in human cells. *Biochem J* **389**, 373-381 (2005).
292. L. Luzhna, P. Kathiria, O. Kovalchuk, Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. *Front Genet* **4**, 131 (2013).
293. J. Campisi, F. d'Adda di Fagagna, Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 729-740 (2007).
294. M. Collado, M. A. Blasco, M. Serrano, Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* **130**, 223-233 (2007).
295. A. Freund, R. M. Laberge, M. Demaria, J. Campisi, Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Mol Biol Cell* **23**, 2066-2075 (2012).
296. G. Krohne, R. Benavente, The nuclear lamins. A multigene family of proteins in evolution and differentiation. *Exp Cell Res* **162**, 1-10 (1986).
297. J. M. Bridger, N. Foeger, I. R. Kill, H. Herrmann, The nuclear lamina. Both a structural framework and a platform for genome organization. *FEBS J* **274**, 1354-1361 (2007).
298. T. Dechat, S. A. Adam, P. Taimen, T. Shimi, R. D. Goldman, Nuclear lamins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a000547 (2010).
299. R. C. Taylor, S. P. Cullen, S. J. Martin, Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 231-241 (2008).
300. K. C. Zimmermann, C. Bonzon, D. R. Green, The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther* **92**, 57-70 (2001).

- 301. C. B. Thompson, Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456-1462 (1995).
- 302. S. J. Martin, C. M. Henry, S. P. Cullen, A perspective on mammalian caspases as positive and negative regulators of inflammation. *Mol Cell* **46**, 387-397 (2012).
- 303. C. M. Henry, E. Hollville, S. J. Martin, Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry. *Methods* **61**, 90-97 (2013).
- 304. J. C. Marine, p53 stabilization: the importance of nuclear import. *Cell Death Differ* **17**, 191-192 (2010).
- 305. M. Oren, Regulation of the p53 tumor suppressor protein. *J Biol Chem* **274**, 36031-36034 (1999).
- 306. F. Jin, Y. Wang, The signaling network that silences the spindle assembly checkpoint upon the establishment of chromosome bipolar attachment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 21036-21041 (2013).
- 307. G. Pereira, T. U. Tanaka, K. Nasmyth, E. Schiebel, Modes of spindle pole body inheritance and segregation of the Bfa1p-Bub2p checkpoint protein complex. *EMBO J* **20**, 6359-6370 (2001).
- 308. J. Basu *et al.*, Mutations in the essential spindle checkpoint gene bub1 cause chromosome missegregation and fail to block apoptosis in Drosophila. *J Cell Biol* **146**, 13-28 (1999).
- 309. M. Dobles, V. Liberal, M. L. Scott, R. Benezra, P. K. Sorger, Chromosome missegregation and apoptosis in mice lacking the mitotic checkpoint protein Mad2. *Cell* **101**, 635-645 (2000).
- 310. P. Kalitsis, E. Earle, K. J. Fowler, K. H. Choo, Bub3 gene disruption in mice reveals essential mitotic spindle checkpoint function during early embryogenesis. *Genes Dev* **14**, 2277-2282 (2000).
- 311. R. Kitagawa, A. M. Rose, Components of the spindle-assembly checkpoint are essential in Caenorhabditis elegans. *Nat Cell Biol* **1**, 514-521 (1999).
- 312. G. Fernandez-Miranda *et al.*, Genetic disruption of aurora B uncovers an essential role for aurora C during early mammalian development. *Development* **138**, 2661-2672 (2011).

313. S. M. Cutts *et al.*, Defective chromosome segregation, microtubule bundling and nuclear bridging in inner centromere protein gene (Incenp)-disrupted mice. *Hum Mol Genet* **8**, 1145-1155 (1999).
314. A. G. Uren *et al.*, Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype. *Curr Biol* **10**, 1319-1328 (2000).
315. Y. Yamanaka *et al.*, Loss of Borealin/DasraB leads to defective cell proliferation, p53 accumulation and early embryonic lethality. *Mech Dev* **125**, 441-450 (2008).
316. A. A. Burds, A. S. Lutum, P. K. Sorger, Generating chromosome instability through the simultaneous deletion of Mad2 and p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 11296-11301 (2005).
317. P. H. O'Farrell, J. Stumpff, T. T. Su, Embryonic cleavage cycles: how is a mouse like a fly? *Curr Biol* **14**, R35-45 (2004).
318. A. D. McAinsh, J. D. Tytell, P. K. Sorger, Structure, function, and regulation of budding yeast kinetochores. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 519-539 (2003).
319. J. P. Welburn, I. M. Cheeseman, Toward a molecular structure of the eukaryotic kinetochore. *Dev Cell* **15**, 645-655 (2008).
320. F. Foijer *et al.*, Spindle checkpoint deficiency is tolerated by murine epidermal cells but not hair follicle stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 2928-2933 (2013).
321. J. R. Bischoff *et al.*, A homologue of *Drosophila* aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J* **17**, 3052-3065 (1998).
322. J. H. Kim, J. S. Kang, C. S. Chan, Sli15 associates with the ipl1 protein kinase to promote proper chromosome segregation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **145**, 1381-1394 (1999).
323. L. Francisco, C. S. Chan, Regulation of yeast chromosome segregation by Ipl1 protein kinase and type 1 protein phosphatase. *Cell Mol Biol Res* **40**, 207-213 (1994).
324. L. Francisco, W. Wang, C. S. Chan, Type 1 protein phosphatase acts in opposition to IpL1 protein kinase in regulating yeast chromosome segregation. *Mol Cell Biol* **14**, 4731-4740 (1994).

325. B. A. Pinsky, C. V. Kotwaliwale, S. Y. Tatsutani, C. A. Breed, S. Biggins, Glc7/protein phosphatase 1 regulatory subunits can oppose the Ipl1/aurora protein kinase by redistributing Glc7. *Mol Cell Biol* **26**, 2648-2660 (2006).
326. S. Black, P. D. Andrews, A. A. Sneddon, M. J. Stark, A regulated MET3-GLC7 gene fusion provides evidence of a mitotic role for *Saccharomyces cerevisiae* protein phosphatase 1. *Yeast* **11**, 747-759 (1995).
327. L. C. Hsu, X. Huang, S. Seasholtz, D. M. Potter, S. M. Gollin, Gene amplification and overexpression of protein phosphatase 1alpha in oral squamous cell carcinoma cell lines. *Oncogene* **25**, 5517-5526 (2006).
328. K. Sogawa *et al.*, Enhanced expression of PP1 gamma 1, a catalytic subunit isoform of protein phosphatase type 1, in invasive ductal carcinoma of the breast. *Cancer Lett* **112**, 263-268 (1997).
329. M. Saadat, Y. Mizuno, N. Takizawa, Y. Kakinoki, R. Rikuchi, Neoplastic alterations in subcellular distribution of type 1 alpha protein phosphatase in rat ascites hepatoma cells. *Cancer Lett* **94**, 165-170 (1995).
330. Y. Imai *et al.*, Up-regulation of nuclear PP1alpha and PP1delta in hepatoma cells. *Int J Oncol* **14**, 121-126 (1999).
331. S. Takakura *et al.*, Genetic alterations and expression of the protein phosphatase 1 genes in human cancers. *Int J Oncol* **18**, 817-824 (2001).
332. K. Sogawa *et al.*, Role of protein phosphatase in malignant osteogenic and soft tissue tumors. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* **93**, 33-42 (1996).
333. H. Fujiki, M. Suganuma, Tumor promotion by inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A: the okadaic acid class of compounds. *Adv Cancer Res* **61**, 143-194 (1993).
334. Y. Jiang, K. L. Scott, S. J. Kwak, R. Chen, G. Mardon, Sds22/PP1 links epithelial integrity and tumor suppression via regulation of myosin II and JNK signaling. *Oncogene* **30**, 3248-3260 (2011).
335. M. Fardilha, S. L. Esteves, L. Korrodi-Gregorio, O. A. da Cruz e Silva, F. F. da Cruz e Silva, The physiological relevance of protein phosphatase 1 and its interacting proteins to health and disease. *Curr Med Chem* **17**, 3996-4017 (2010).

336. M. Fardilha *et al.*, Protein phosphatase 1 complexes modulate sperm motility and present novel targets for male infertility. *Mol Hum Reprod* **17**, 466-477 (2011).
337. J. Figueiredo, E. S. O. A. da Cruz, M. Fardilha, Protein phosphatase 1 and its complexes in carcinogenesis. *Curr Cancer Drug Targets* **14**, 2-29 (2014).
338. J. L. McConnell, B. E. Wadzinski, Targeting protein serine/threonine phosphatases for drug development. *Mol Pharmacol* **75**, 1249-1261 (2009).
339. R. H. Wang, C. W. Liu, V. I. Avramis, N. Berndt, Protein phosphatase 1 α -mediated stimulation of apoptosis is associated with dephosphorylation of the retinoblastoma protein. *Oncogene* **20**, 6111-6122 (2001).
340. Z. Lu, G. Wan, H. Guo, X. Zhang, X. Lu, Protein phosphatase 1 inhibits p53 signaling by dephosphorylating and stabilizing Mdmx. *Cell Signal* **25**, 796-804 (2013).
341. G. Flores-Delgado, C. W. Liu, R. Sposto, N. Berndt, A limited screen for protein interactions reveals new roles for protein phosphatase 1 in cell cycle control and apoptosis. *J Proteome Res* **6**, 1165-1175 (2007).
342. H. Ceulemans, M. Bollen, Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiol Rev* **84**, 1-39 (2004).
343. A. Gonzalez-Loyola *et al.*, Aurora B Overexpression Causes Aneuploidy and p21Cip1 Repression during Tumor Development. *Mol Cell Biol* **35**, 3566-3578 (2015).
344. S. Piatti, C. Lengauer, K. Nasmyth, Cdc6 is an unstable protein whose de novo synthesis in G1 is important for the onset of S phase and for preventing a 'reductional' anaphase in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **14**, 3788-3799 (1995).
345. B. M. Stern, A. W. Murray, Lack of tension at kinetochores activates the spindle checkpoint in budding yeast. *Curr Biol* **11**, 1462-1467 (2001).
346. A. S. Bajer, Functional autonomy of monopolar spindle and evidence for oscillatory movement in mitosis. *J Cell Biol* **93**, 33-48 (1982).
347. S. Buvelot, S. Y. Tatsutani, D. Vermaak, S. Biggins, The budding yeast Ipl1/Aurora protein kinase regulates mitotic spindle disassembly. *J Cell Biol* **160**, 329-339 (2003).

348. K. Shirk, H. Jin, T. H. Giddings, Jr., M. Winey, H. G. Yu, The Aurora kinase Ipl1 is necessary for spindle pole body cohesion during budding yeast meiosis. *J Cell Sci* **124**, 2891-2896 (2011).
349. K. B. Lukasiewicz, W. L. Lingle, Aurora A, centrosome structure, and the centrosome cycle. *Environ Mol Mutagen* **50**, 602-619 (2009).
350. S. Dutertre, S. Descamps, C. Prigent, On the role of aurora-A in centrosome function. *Oncogene* **21**, 6175-6183 (2002).
351. A. R. Barr, F. Gergely, Aurora-A: the maker and breaker of spindle poles. *J Cell Sci* **120**, 2987-2996 (2007).
352. J. Petersen, J. Paris, M. Willer, M. Philippe, I. M. Hagan, The S. pombe aurora-related kinase Ark1 associates with mitotic structures in a stage dependent manner and is required for chromosome segregation. *J Cell Sci* **114**, 4371-4384 (2001).
353. R. R. Adams *et al.*, INCENP binds the Aurora-related kinase AIRK2 and is required to target it to chromosomes, the central spindle and cleavage furrow. *Curr Biol* **10**, 1075-1078 (2000).
354. M. R. Stratton, P. J. Campbell, P. A. Futreal, The cancer genome. *Nature* **458**, 719-724 (2009).
355. L. M. Merlo, J. W. Pepper, B. J. Reid, C. C. Maley, Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer* **6**, 924-935 (2006).
356. P. C. Nowell, The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* **194**, 23-28 (1976).
357. M. Giam, G. Rancati, Aneuploidy and chromosomal instability in cancer: a jackpot to chaos. *Cell Div* **10**, 3 (2015).
358. B. A. Weaver, D. W. Cleveland, Does aneuploidy cause cancer? *Curr Opin Cell Biol* **18**, 658-667 (2006).
359. L. M. Zasadil, E. M. Britigan, B. A. Weaver, 2n or not 2n: Aneuploidy, polyploidy and chromosomal instability in primary and tumor cells. *Semin Cell Dev Biol* **24**, 370-379 (2013).
360. S. L. Thompson, S. F. Bakhoum, D. A. Compton, Mechanisms of chromosomal instability. *Curr Biol* **20**, R285-295 (2010).

361. D. G. Albertson, C. Collins, F. McCormick, J. W. Gray, Chromosome aberrations in solid tumors. *Nat Genet* **34**, 369-376 (2003).
362. I. Perez de Castro, G. de Carcer, M. Malumbres, A census of mitotic cancer genes: new insights into tumor cell biology and cancer therapy. *Carcinogenesis* **28**, 899-912 (2007).
363. S. Nath, D. Ghatak, P. Das, S. Roychoudhury, Transcriptional control of mitosis: deregulation and cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)* **6**, 60 (2015).
364. H. Katayama, W. R. Brinkley, S. Sen, The Aurora kinases: role in cell transformation and tumorigenesis. *Cancer Metastasis Rev* **22**, 451-464 (2003).
365. K. Araki, K. Nozaki, T. Ueba, M. Tatsuka, N. Hashimoto, High expression of Aurora-B/Aurora and Ip11-like midbody-associated protein (AIM-1) in astrocytomas. *J Neurooncol* **67**, 53-64 (2004).
366. S. E. Gibson, W. F. Zeng, R. J. Weil, R. A. Prayson, Aurora B kinase expression in ependymal neoplasms. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **16**, 274-278 (2008).
367. K. Hegyi, K. Egervari, Z. Sandor, G. Mehes, Aurora kinase B expression in breast carcinoma: cell kinetic and genetic aspects. *Pathobiology* **79**, 314-322 (2012).
368. S. Tanaka *et al.*, Aurora kinase B is a predictive factor for the aggressive recurrence of hepatocellular carcinoma after curative hepatectomy. *Br J Surg* **95**, 611-619 (2008).
369. P. Chieffi, An Overview on Predictive Biomarkers of Testicular Germ Cell Tumors. *J Cell Physiol*, (2016).
370. S. L. Carter, A. C. Eklund, I. S. Kohane, L. N. Harris, Z. Szallasi, A signature of chromosomal instability inferred from gene expression profiles predicts clinical outcome in multiple human cancers. *Nat Genet* **38**, 1043-1048 (2006).
371. Z. Xu, P. Vagnarelli, H. Ogawa, K. Samejima, W. C. Earnshaw, Gradient of increasing Aurora B kinase activity is required for cells to execute mitosis. *J Biol Chem* **285**, 40163-40170 (2010).

- 372. J. Liu, F. Cheng, L. W. Deng, MLL5 maintains genomic integrity by regulating the stability of the chromosomal passenger complex through a functional interaction with Borealin. *J Cell Sci* **125**, 4676-4685 (2012).
- 373. K. Sasai, H. Katayama, D. H. Hawke, S. Sen, Aurora-C Interactions with Survivin and INCENP Reveal Shared and Distinct Features Compared with Aurora-B Chromosome Passenger Protein Complex. *PLoS One* **11**, e0157305 (2016).
- 374. H. Katayama *et al.*, Mitotic kinase expression and colorectal cancer progression. *J Natl Cancer Inst* **91**, 1160-1162 (1999).
- 375. N. Keen, S. Taylor, Aurora-kinase inhibitors as anticancer agents. *Nat Rev Cancer* **4**, 927-936 (2004).
- 376. J. Bain *et al.*, The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J* **408**, 297-315 (2007).
- 377. F. Girdler *et al.*, Molecular basis of drug resistance in aurora kinases. *Chem Biol* **15**, 552-562 (2008).
- 378. T. W. Failes *et al.*, Evolution of resistance to Aurora kinase B inhibitors in leukaemia cells. *PLoS One* **7**, e30734 (2012).
- 379. Z. Xu *et al.*, INCENP-aurora B interactions modulate kinase activity and chromosome passenger complex localization. *J Cell Biol* **187**, 637-653 (2009).
- 380. S. Barbanis *et al.*, INCENP (inner centromere protein) is overexpressed in high grade non-Hodgkin B-cell lymphomas. *Pathol Oncol Res* **15**, 11-17 (2009).
- 381. E. Unsal, B. Degirmenci, B. Harmanda, B. Erman, N. Ozlu, A small molecule identified through an in silico screen inhibits Aurora B-INCENP interaction. *Chem Biol Drug Des*, (2016).
- 382. F. H. Gohard, D. J. St-Cyr, M. Tyers, W. C. Earnshaw, Targeting the INCENP IN-box-Aurora B interaction to inhibit CPC activity in vivo. *Open Biol* **4**, 140163 (2014).
- 383. H. G. Nguyen *et al.*, Deregulated Aurora-B induced tetraploidy promotes tumorigenesis. *FASEB J* **23**, 2741-2748 (2009).

Bibliografia

- 384. A. Kanda *et al.*, Aurora-B/AIM-1 kinase activity is involved in Ras-mediated cell transformation. *Oncogene* **24**, 7266-7272 (2005).
- 385. F. W. Pagliuca *et al.*, Quantitative proteomics reveals the basis for the biochemical specificity of the cell-cycle machinery. *Mol Cell* **43**, 406-417 (2011).
- 386. M. S. Longtine *et al.*, Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 953-961 (1998).
- 387. R. S. Sikorski, P. Hieter, A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**, 19-27 (1989).
- 388. K. Nishimura, T. Fukagawa, H. Takisawa, T. Kakimoto, M. Kanemaki, An auxin-based degron system for the rapid depletion of proteins in nonplant cells. *Nat Methods* **6**, 917-922 (2009).
- 389. F. Monje-Casas, A. Amon, Cell polarity determinants establish asymmetry in MEN signaling. *Dev Cell* **16**, 132-145 (2009).
- 390. R. Visintin, E. S. Hwang, A. Amon, Cfi1 prevents premature exit from mitosis by anchoring Cdc14 phosphatase in the nucleolus. *Nature* **398**, 818-823 (1999).
- 391. J. A. D'Aquino, J. Tetenbaum-Novatt, A. White, F. Berkovitch, D. Ringe, Mechanism of metal ion activation of the diphtheria toxin repressor DtxR. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 18408-18413 (2005).

***“The more I learn,
the more I realize how much I don't know”***

Albert Einstein